

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Klonierung, Expression und subzelluläre Lokalisation
zweier tumorassoziiierter Gene – CRIP1 und LDOC1**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elena Rebecca Margarita Weber
aus Herrenberg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Schindlbeck
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Ansgar Brüning
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Datum der mündlichen Prüfung: 15.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung und Hintergrund.....	1
1.1 Krebs – eine Volkskrankheit in Zahlen.....	1
1.2 Karzinogenese – die Entstehung von Krebs	2
1.3 Das Mammakarzinom.....	4
1.3.1 Risikofaktoren, Früherkennung und Prognose.....	5
1.3.2 Pathogenese.....	7
1.3.3 Klinisch relevante prognostische Faktoren und ihre therapeutische Bedeutung.....	8
1.3.4 Rezeptoren und ihre Antikörper.....	10
1.4 Das Zervixkarzinom.....	10
1.4.1 Anatomie der Cervix uteri und Pathogenese des Zervixkarzinoms.....	12
1.4.2 Molekularer Mechanismus der Zelltransformation beim Zervixkarzinom	13
1.4.3 Screeningverfahren und Biomarker	14
1.5 LDOC1 - Struktur, Funktion, Regulation und Vorkommen	15
1.5.1 LDOC1 im Zusammenhang mit Onkogenese und als möglicher prognostischer Faktor.....	16
1.6 CRIP1 - Struktur, Funktion, Regulation und Vorkommen.....	17
1.6.1 CRIP1 im Zusammenhang mit Onkogenese und als möglicher prognostischer Faktor.....	18
2 Materialien und Methoden	21
2.1 Geräte	21
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3 Chemikalien und Biochemikalien	22
2.4 Medikamente	24
2.5 Antikörper.....	24
2.6 Oligonukleotide und Primer.....	25
2.7 Gensequenzen LDOC1 und CRIP1	26

2.8	Komplettsysteme	27
2.9	Epithelzelllinien	27
2.10	Bakterien	28
2.11	Zellkultivierung und Anlegen von Gefrierkulturen.....	28
2.11.1	Materialien.....	28
2.11.2	Protokoll zur Anlegung von Gefrierkulturen	28
2.12	RNA Isolation aus den Zellen der Zellkultur.....	29
2.12.1	Präparationen mit dem TRIzol Reagent.....	29
2.12.2	Materialien.....	29
2.12.3	Das TRIzol Protokoll	29
2.13	Präparation mit dem NucleoSpin RNA Clean-up Kit	30
2.13.1	Materialien.....	30
2.13.2	NucleoSpin-RNA-Clean-up-Kit-Protokoll	31
2.14	Reverse-Transkriptase-Reaktion zur cDNA-Synthese.....	31
2.14.1	Materialien.....	32
2.14.2	Protokoll der Reverse-Transkriptase-Reaktion.....	32
2.15	Polymerase Kettenreaktion.....	33
2.15.1	Materialien.....	33
2.15.2	Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.16	Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion (Agarose-Gelelektrophorese)	34
2.16.1	Materialien.....	34
2.16.2	Protokoll der Agarose-Gelelektrophorese und Auswertung	34
2.17	PCR-Klonierung.....	35
2.17.1	Herstellung des pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektors	36
2.17.2	Materialien.....	37
2.17.3	TOPO-Klonierungsprotokoll – Transformation der DNA in kompetente <i>E.-coli</i> -Bakterien.....	37
2.17.4	Transformation mittels Elektroporation	37
2.18	Das Herstellen von flüssigem Wachstumsmedium und LB-Agar.....	38
2.18.1	Materialien.....	38
2.18.2	Protokoll zur Herstellung des Ampicillin-versetzten LB-Agar	38
2.19	Ausplattieren und Selektionieren der Bakterien.....	39
2.20	Plasmidpräparation.....	39
2.20.1	Materialien.....	39

2.20.2	Plasmidpräparationsprotokoll.....	40
2.21	Transfektion	40
2.21.1	Materialien	41
2.21.2	Transfektionsprotokoll.....	41
2.22	Zellfixierung.....	41
2.22.1	Materialien	41
2.22.2	Protokoll der Zellfixierung.....	42
2.23	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.....	42
2.23.1	Materialien	42
2.23.2	Protokoll zur Präparation der Zellen und Mikroskopie	42
2.24	Humaner Zytokin-Antikörper-Array	43
2.24.1	Materialien	43
2.24.2	Protokoll des Zytokinarrays.....	44
2.25	Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS).....	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Immunhistochemische Darstellung von Her2/neu und CRIP1 in MDA-MB-453 Zellen	47
3.2	Die Lokalisation von CRIP1 in der Zelle – eine Immunfluoreszenzanalyse	48
3.2.1	CRIP1 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453.....	48
3.2.2	CRIP1 in der Kolonkarzinomzelllinie TC7	49
3.3	Quantifizierung und Regulation der CRIP1 Expression	49
3.3.1	FACS-Analyse der Her2/neu und CRIP1 Expression in Brustkrebszelllinien	49
3.3.2	FACS-Analyse der CRIP1 Expression mit Heregulin, Epidermal Growth Factor, Lapatinib und Sorafenib.....	51
3.3.3	RT-PCR mit Lapatinib und Sorafenib.....	52
3.3.4	Dexamethason	53
3.3.5	Zebularin.....	55
3.3.6	Transforming Growth Factor β (TGF β)	55
3.4	CRIP1-Expressionsanalyse mittels PCR in Zervixkarzinomzelllinien.....	56
3.5	Klonierung/Reexpression von CRIP1	57
3.5.1	Selektion der CRIP1 überexprimierenden Bakterienkolonien.....	57

3.6	CRIP1 in dem CRIP1-V5-überexprimierenden, stabilen Zellklon der Zelllinie MCF7	60
3.7	Zytokin-Antikörper-Array.....	61
3.8	LDOC1	62
3.8.1	Klonierung und Expression von LDOC1.....	62
3.8.2	Überexpression von LDOC1 induziert Zelltod in Zervixkarzinomzelllinien.....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	CRIP1 und Her2/neu – ein Zusammenhang?.....	65
4.2	CRIP1 Regulation.....	68
4.3	CRIP1 als immunmodulatorisches Protein	72
4.4	CRIP1 Lokalisation	73
4.5	LDOC1	73
5	Zusammenfassung.....	75
	Literaturverzeichnis	77
	Internetquellen.....	91
	Publikationen.....	93
	Danksagung.....	95
	Curriculum Vitae..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
	Eidesstattliche Versicherung.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012.....	2
Abb. 2:	Neuerkrankungs- und Sterberaten für Brustkrebs in Deutschland.	5
Abb. 3:	Eigene schematische Darstellung der Mammakarzinogenese, der möglichen Ursachen und therapeutischer Interventionen.....	7
Abb. 4:	Flussdiagramm zur Entwicklung der HPV-Infektion in der Cervix uteri	13
Abb. 5:	Aminosäuresequenz des cysteine-rich intestinal protein in Mäusen.....	17
Abb. 6:	Strukturmodell von CRIP1 mit zwei LIM-Domänen und einem C-terminalen Loop.....	18
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Aufnahme des PCR-Produktes in den Vektor.	36
Abb. 8:	Darstellung der wichtigsten Gene des pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektors.....	36
Abb. 9:	Her2/neu- und CRIP1-Expression in MDA-MB-453-Zellen.....	47
Abb. 10:	Immunfluoreszenz mit perinukleärer Lokalisation von CRIP1 in der Mammakarzinom- zelllinie MDA-MB-453.	48
Abb. 11:	Immunfluoreszenzanalyse mit zellkernnaher Lokalisation von CRIP1 in der Kolonkarzinomzelllinie TC7.	49
Abb. 12:	Expression von Her2/neu und CRIP1 in Brustkrebszelllinien, FACS-Analyse.....	50
Abb. 13:	Relative Fluoreszenzanreicherung in der Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 (A) und in der Brustkrebszelllinie T47D (B) unter medikamentöser Her2/neu-Inhibierung sowie unter Stimulation mit Heregulin und EGF, FACS-Analyse.....	51
Abb. 14:	CRIP1-Expression in der Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 mit Lapatinib (10 µg/ml) und Sorafenib (10 µg/ml) nach 12 Stunden Inkubation.	52
Abb. 15:	CRIP1-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-453 und MCF7 versetzt mit Lapatinib und Sorafenib (10 µg/ml) nach 12 Stunden Inkubation.	53
Abb. 16:	CRIP1-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-453, MCF7 und T47D mit und ohne Dexamethason (100 nM).	54

Abb. 17:	CRIP1-Expression in der Mammakarzinomzelllinie HBL-100 mit und ohne Dexamethason (100 nM).	54
Abb. 18:	Zebularin-Effekt (50 mg/ml) nach 48 Stunden Inkubation in der CRIP1-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MCF7.	55
Abb. 19:	TGF- β -Effekt (10 ng/ml) nach 12 Stunden Inkubation auf die CRIP1-überexprimierenden Brustkrebszelllinien T47D und MCF7.	56
Abb. 20:	PCR-Analyse der CRIP1-Expression in den Zervixkarzinomzelllinien CaSki, HeLa, SW756, Me180, C-33 A und SiHa.	56
Abb. 21:	Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des TOPO-Vektors.	58
Abb. 22:	Auswahl der Kolonien, die ein Plasmid aufgenommen haben.	59
Abb. 23:	Der mit dem CRIP1-V5-Expressionsplasmid transfizierte stabile Zellklon der Zelllinie MCF7.	60
Abb. 24:	Zytokinarray.	61
Abb. 25:	Ektopische Überexpression von LDOC1 induziert Apoptose in HeLa-Zellen.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Tabelle zur Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C00-C97 ohne C44.	1
Tabelle 2:	Tabelle zur Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Brustdrüsenkrebs für Deutschland, ICD-10C50.....	4
Tabelle 3:	Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Gebärmutterhalskrebs für Deutschland, ICD-10C53	11
Tabelle 4:	Übersicht der verwendeten Primer.....	25

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BET	Brusterhaltende Therapie/Operation
BME	2-Mercaptoethanol
BRCA	Breast Cancer
bZIP	Basic leucine zipper domain
CA 125	Cancer Antigen 125
cDNA	Complementary DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CRIP1	Cysteine-rich intestinal protein 1
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER α/β	Östrogenrezeptor α/β
FAM	6-carboxyfluorescein
FACS	Fluorescence activated cell sorting/scanning
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSC	Forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
HER	Human epidermal growth factor receptor
HBV/HCV	Hepatitis-B/-C-Virus
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HNPCC	Hereditary non polyposis colorectal cancer
HPV	Humanes Papillomavirus
HRG	Heregulin
HRP	Horseradish Peroxidase

ICD	International Classification of Diseases
LB	Lysogeny broth
LDOC1	Leucine zipper downregulated in ovarian cancer 1
LT- α	Lymphotoxin α
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization Imaging
MAP	Mitogen activated protein
M-MVL RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion
pRB	Retinoblastom-Protein
Ras	Rat sarcoma
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SERM	Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
SCC	Squamous cell carcinoma
SOC	SOB (Super Optimal Broth) mit 20 mM Glucose
SSC	Side scatter
STIKO	Ständige Impfkommission
TA	Tumorassoziertes Antigen
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TGF- α	Transforming growth factor α
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
WHO	World Health Organisation
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Krebs – eine Volkskrankheit in Zahlen

Nach aktuellen Zahlen der World Health Organisation (WHO) beläuft sich die Anzahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen weltweit auf geschätzte 14 Millionen, die Mortalität liegt bei ca. 8,2 Millionen. Gemäß der aktuellen Publikation „Krebs in Deutschland“ (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Krebs in Deutschland 2009/2010 2013), einer gemeinsamen Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., ist als Folge des demografischen Wandels in Deutschland ein Anstieg der Inzidenz von Krebserkrankungen um ca. 20 % innerhalb der nächsten 20 Jahre zu erwarten. Die Zahl an Neuerkrankungen soll sich weltweit in den nächsten zwanzig Jahren mehr als verdoppeln (Stewart 2014). Von ca. 478 000 Neuerkrankungen im Jahr 2012 (bei Männern ca. 252 000 und bei Frauen ca. 226 000, siehe Tab. 1) betreffen rund 50 % die Brustdrüse, die Prostata, den Darm oder die Lunge (siehe Abb. 1). Jeder zweite Mann (51 %) und ca. jede dritte Frau (43 %) erkranken in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Krebs. Bei Frauen ist das Mammakarzinom dabei mit rund 70 000 Neuerkrankungen pro Jahr unbestritten die häufigste maligne Tumorerkrankung.

Tabelle 1: Tabelle zur Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C00-C97 ohne C44.

	2011		2012		Prognose für 2016	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	259.090	229.720	252.060	225.890	266.800	231.900
rohe Erkrankungsrate ¹	661,3	559,0	641,3	549,3	666,2	559,8
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	460,0	356,2	440,2	348,9	437,8	345,2
mittleres Erkrankungsalter ³	70	69	70	69		
Sterbefälle	119.368	101.546	119.717	101.206		
rohe Sterberate ¹	304,6	247,1	304,6	246,1		
standardisierte Sterberate ^{1,2}	202,7	129,7	198,6	127,4		
5-Jahres-Prävalenz	813.100	789.100	810.300	790.500		
	nach 5 Jahren		nach 10 Jahren			
absolute Überlebensrate (2011–2012) ⁴	52 (47–55)	59 (55–63)	40 (34–42)	48 (44–50)		
relative Überlebensrate (2011–2012) ⁴	62 (56–65)	67 (62–70)	57 (51–61)	62 (58–65)		

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

(Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Krebs in Deutschland 2009/2010 2013)
Copyright ©Robert Koch-Institut, mit freundlicher Genehmigung.

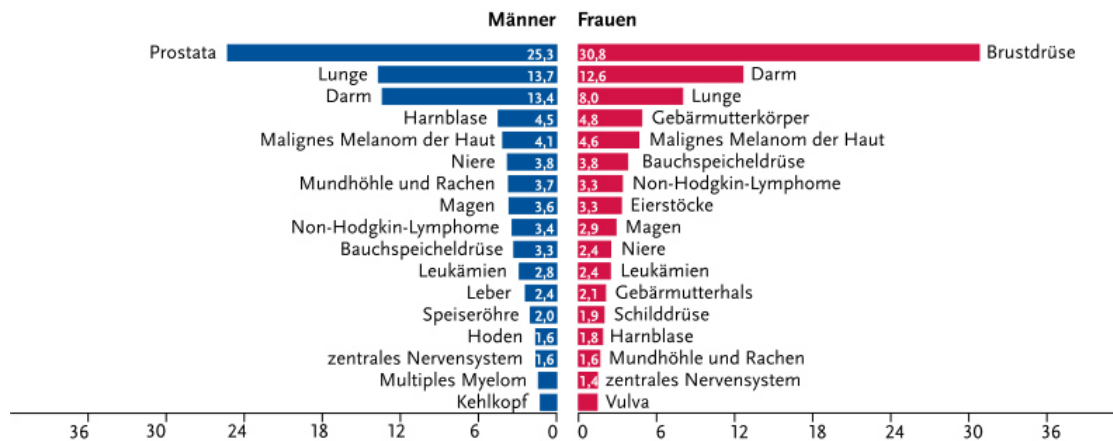


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012 (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Krebs in Deutschland 2009/2010 2013) Copyright ©Robert Koch-Institut, mit freundlicher Genehmigung.

Die Zahl des Zervixkarzinoms ist mit rund 4700 Neuerkrankungen deutlich geringer und in den letzten Jahren auf diesem niedrigen Niveau stabil geblieben, jedoch sind nach wie vor 20 % der Krebserkrankungen in Schichten mit mittlerem oder niedrigem Auskommen auf virale Infektionen zurückzuführen (z. B. HPV – Humanes Papillomavirus, HBV/HCV – Hepatitis-B-/C-Virus). Anhand dieser Zahlen wird die hohe wissenschaftliche und klinische Signifikanz von bösartigen Tumoren in unserer heutigen Zeit sehr deutlich. Der wissenschaftliche Schwerpunkt liegt dabei nicht ausschließlich auf den therapeutischen Möglichkeiten, sondern vor allem auch bei den Präventions-, Früherkennungs- und Screeningverfahren sowie bei den Ursachen der Tumorentstehung selbst.

1.2 Karzinogenese – die Entstehung von Krebs

Die Tumorgenese, auch Karzinogenese genannt, ist ein komplexer, bislang noch nicht gänzlich verstandener Prozess. Lange Zeit herrschte die Meinung vor, dass ein bestimmtes Kanzerogen in Kombination mit einem Risikofaktor zu einer Schädigung des genetischen Materials der Zelle und somit zu einer fehlerhaften Programmierung führe. Knudsons bekannte Two-Hit-Theorie basiert auf der Annahme, dass beide Allele eines Gens homologer Chromosomen genetisch verändert sein müssen, damit ein Tumor entstehen kann (Knudson 1997). Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurden diverse Modelle zur Pathogenese von Karzinomen entwickelt, die jeweils ihren Schwerpunkt auf unterschiedliche Auslöser legen (Vineis et al. 2010). Beispiele der wissenschaftlichen Geschichte, die eine genetische Komponente belegen, sind das Lynch-Syndrom (das heutige HNPCC – *hereditary non polyposis colorectal cancer*), das Li-Fraumeni-Syndrom, sowie auch das Protoonkogen Ras (*rat sarcoma*),

dessen veränderte Form vermehrt vor allem in Pankreaskarzinomen und bei malignen Erkrankungen des myelotischen Systems vorkommt und in den 1980er Jahren von mehreren Forschungsgruppen untersucht wurde (Lynch et al. 1966; Li und Fraumeni 1969). In den 1990er Jahren wurden weiterhin genetische Mutationen des Mammakarzinoms identifiziert, die sog. BRCA (*Breast Cancer*) 1- und 2-Mutationen (Hall et al. 1990; Miki et al. 1994; Wooster und Stratton 1995).

Letztlich entscheidend für die Tumorentstehung ist die übermäßige Zahl der proliferierenden Zellen, die diejenige der absterbenden übersteigt. Die Auffassung der wesentlichen Veränderungen der Mechanismen der Zellregulation einer Zelle, die zu deren malignen Entartung beitragen, wurde in den letzten 20 Jahren vor allem durch zwei Artikel geprägt, veröffentlicht in den Jahren 2000 und 2011 von Hanahan und Weinberg. In „The hallmarks of cancer“ (Hanahan und Weinberg 2011) werden in der ursprünglichen Fassung sechs und in der überarbeiteten Version acht „Markenzeichen“, sog. „Hallmarks“, beschrieben, die für die Entartung einer Zelle verantwortlich gemacht werden. Hierzu gehören:

1. eine Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
2. ein Nichtansprechen auf inhibierende Signale
3. ein Ausbleiben der terminalen Differenzierung und der damit zusammenhängenden Beendigung der Proliferation
4. ein unbegrenztes Wachstumspotenzial der entdifferenzierten Zellen, ein Ausbleiben des programmierten Zelltodes und letztlich eine Gewebeinfiltration
5. die Invasion in umliegende Gewebe (Metastasierung)
6. die nachhaltige Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Aufrechterhaltung und Selbstversorgung des Zellkonglomerats.

Die später hinzugefügten Hallmarks ergänzen Folgendes:

7. die Überprogrammierung des Energiestoffwechsels
8. das Umgehen von Angriffen der Immunabwehr.

Hanahan und Weinberg sehen demnach Krebs als eine Erkrankung einer einzelnen Zelle und die Genetik als Schlüssel zur Heilung (Weinberg 1999). Kritiker halten diese Sicht nach heutigem Stand der Wissenschaft für zu einseitig (Sonnenschein und Soto 2013). Sie glauben an ein Zusammenspiel von Mutation, genetischer Instabilität, hereditären Faktoren, äußeren Karzinogenen, Epigenetik und Zellselektion (Peltomäki 2012).

LDOC1 (*Leucine zipper downregulated in ovarian cancer 1*) und CRIP1 (*Cysteine-rich intestinal protein 1*) wurden in dieser Arbeit im Hinblick auf Ihre Rolle in diesem komplexen Prozess untersucht. LDOC1 ist dabei in seiner Rolle als Tumorsuppressorgen von Bedeutung in der Karzinogenese (Lee et al. 2013). Bezüglich CRIP1 wurde eine Überexpression des Gens in unterschiedlichen Tumorzellen nachgewiesen (Ma et al. 2003; Liu et al. 2004; Chen et al. 2003; Wang et al. 2007; Groene et al. 2006; Terris et al. 2002). Die genaue Funktion von CRIP1 im Zellorganismus ist noch nicht hinreichend geklärt und war darum Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit.

1.3 Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist mit einer Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit der häufigste maligne Tumor der Frau und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen. Das Robert Koch-Institut (2015) gibt rund 70 000 Neuerkrankungsfälle an invasivem Mammakarzinom für das Jahr 2012 an (siehe Tabelle 2). Nach Einführung des Mammografie-Screening-Verfahrens in Deutschland im Jahr 2005 stiegen die Zahlen zunächst sprunghaft an (siehe Abb. 2). Etwa jede achte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, jede vierte ist bei Diagnosestellung unter 55 Jahre alt (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2: Tabelle zur Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Brustdrüsenkrebs für Deutschland, ICD-10C50.

Neuerkrankungen	Frauen	Männer	Sterbefälle	Frauen	Männer
Absolute Zahl	71.640	682	Absolute Zahl	17.853	156
Mittleres Erkrankungsalter	64,3	69,9	Mittleres Sterbealter	72,6	74,4
Rohe Rate	174,0	1,7	Rohe Rate	43,4	0,4
Altersstandardisierte Rate	119,3	1,1	Altersstandardisierte Rate	23,6	0,2
Aktueller Trend ¹	+1,3%		Aktueller Trend ¹	-1,2%	
Altersstandardisierte Rate (EU)	106,6		Altersstandardisierte Rate (EU)	22,0	0,3
Prognose für 2020 (absolute Zahl)	77.600 ²		Aktueller Trend (EU) ¹	-1,5%	
Überleben			Prävalenz		
Relatives 5-Jahres-Überleben	88%	77%	5-Jahres-Prävalenz	315.740	2.420
Relatives 10-Jahres-Überleben	82%	65%	10-Jahres-Prävalenz	551.960	3.760

¹ durchschnittliche jährliche Veränderung der altersstandardisierten Rate zwischen 2003 und 2013

² unter der Annahme ab 2013 gleichbleibender Erkrankungsrate für Frauen zwischen 50 und 74 Jahren

(Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Krebs in Deutschland 2009/2010 2013)
Copyright ©Robert Koch-Institut, mit freundlicher Genehmigung.

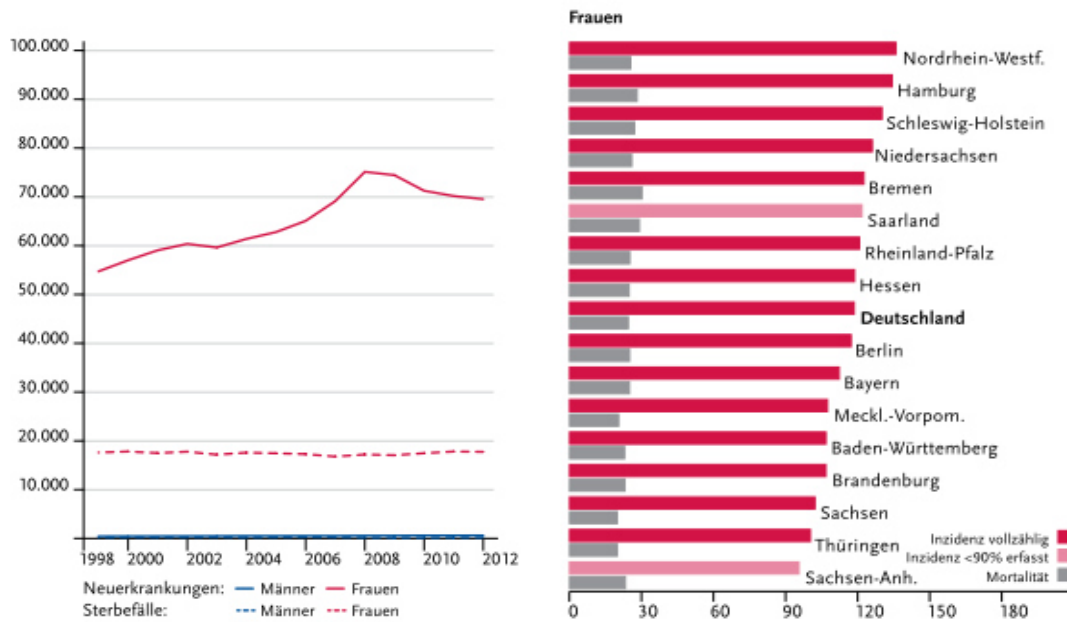


Abb. 2: Neuerkrankungs- und Sterberaten für Brustkrebs in Deutschland.
 Links: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle Brustkrebs nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 1999 – 2012. Rechts: Erfasste altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten bzgl. Brustkrebs in den Bundesländern, Frauen, ICD-10 C50, 2011 – 2012, je 100.000 (Europastandard). Copyright ©Robert Koch-Institut, mit freundlicher Genehmigung.

1.3.1 Risikofaktoren, Früherkennung und Prognose

Eine frühe oder eine späte erste Regelblutung, Nulliparität oder eine späte erste Schwangerschaft, eine Hormonersatztherapie, insbesondere mit Östrogen/Gestagen-Kombinationspräparaten sowie auch Adipositas, Nikotinkonsum und Mangel an Bewegung in und nach den Wechseljahren sind mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Weitere determinierende Risikofaktoren sind u. a. Strahlenbelastung und eine familiäre Prädisposition (p53, BRCA1, BRCA2). Die Mortalität zeigt sich seit den 1990er Jahren in Deutschland und auch z. B. in den USA rückläufig. Besonders die Entwicklung von Methoden zur Früherkennung von malignen Veränderungen oder Präkanzerosen sowie die Entwicklung einer adjuvanten systemischen Therapie haben zu einer Verbesserung des therapeutischen Ergebnisses und der Überlebensrate bei Brustkrebspatienten geführt (National Cancer Institute 2015). Diese Methoden der Früherkennung sind jedoch nicht fehlerfrei und können sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse hervorbringen. Daher wird auf diesem Gebiet weiterhin intensiv geforscht, wobei der Schwerpunkt nicht nur auf der Früherkennung, sondern auch auf der genauen Lokalisation, der Differenzierung und der Prognoseerhebung zur Beurteilung der weiteren Therapiemöglichkeiten liegt.

Die klinische Einteilung der Mammakarzinome erfolgt nach der FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*)- bzw. TNM (Tumor-Nodus-Metastasen)-Klassifikation (Sinn et al. 2010). Hier spielen weitere Faktoren wie Tumorgröße und der Befall von axillären Lymphknoten eine Rolle. Neben der operativen Exzision des Lokalbefundes fällt der adjuvanten Therapie in Form einer Bestrahlung und/oder systemischen Therapie eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Prognose zu. Auch kleinste lokale Befunde eines invasiven Karzinoms können nach operativer Entfernung und Bestrahlung Fernmetastasen entwickeln (Bartram et al. 2010). Da das Mammakarzinom eine Erkrankung mit einem hohen Risiko des (späten) Rezidivs ist, sind die sonst häufig verwendeten 5-Jahres-Überlebensraten obsolet (Hiddemann 2010). Für die prognostische Einschätzung der Erkrankung erfolgt daher eine komplexe Beurteilung durch prognostische Faktoren, die bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung festzustellen sind, und prädiktive Faktoren, die im Zusammenhang mit dem Ansprechen des Tumors auf die Therapie stehen (z. B. Östrogen- und Progesteronrezeptorgehalt des Tumors). Auf die aktuell relevanten prognostischen Faktoren wird in Bezug auf diese Arbeit genauer in Unterabschnitt 1.3.3 eingegangen.

1.3.2 Pathogenese

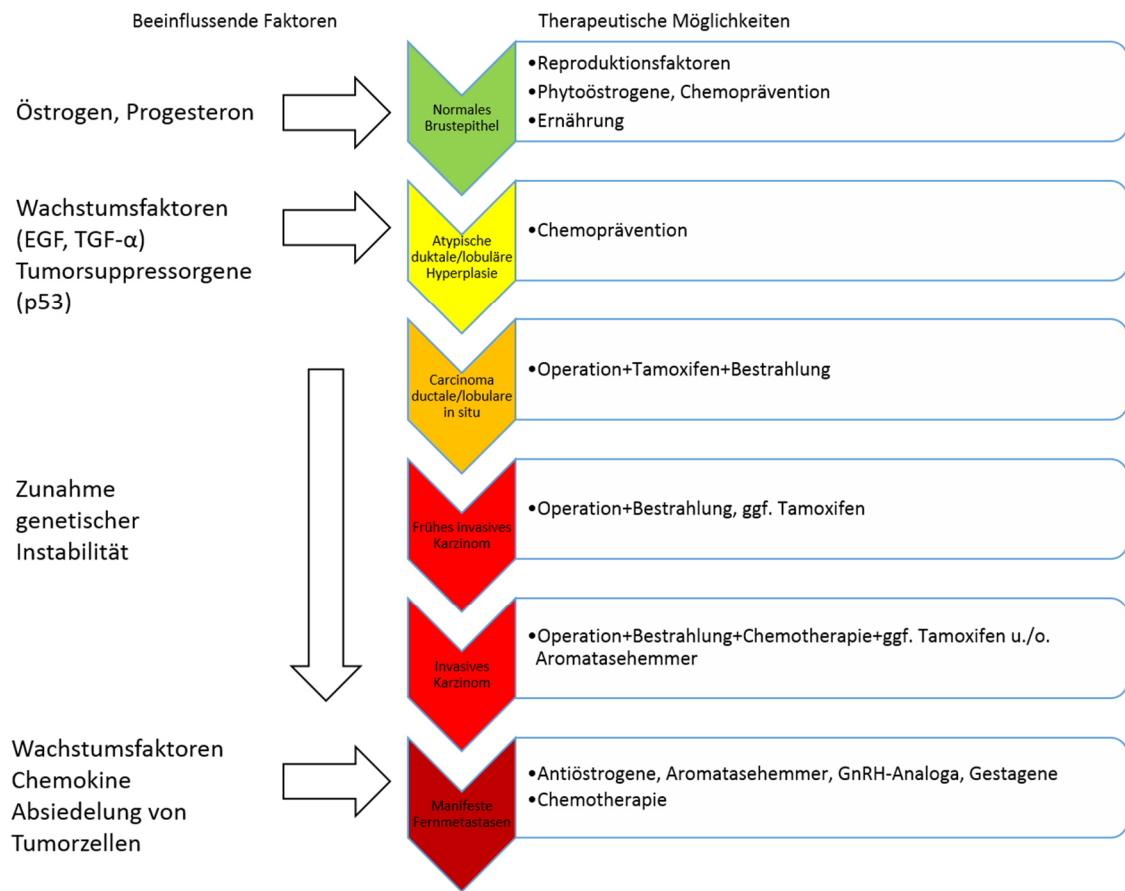


Abb. 3: Eigene schematische Darstellung der Mammakarzinogenese, der möglichen Ursachen und therapeutischer Interventionen verändert nach (Kaufmann 2011). Chemoprävention bezeichnet hierbei z.B. selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) wie Tamoxifen. Copyright ©Springer-Verlag GmbH, mit freundlicher Genehmigung.

Um Ideen über mögliche neue prognostische und therapeutische Faktoren zu entwickeln und damit die Therapie individuell zu optimieren, ist ein genaueres Verständnis der Pathogenese einer Erkrankung notwendig. Der Einfluss von Östrogen wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts vermutet. Man begann mit der therapeutischen Entfernung der Ovarien, woraufhin bei den Patientinnen ein Rückgang von Metastasen beschrieben wurde. Mit der Entdeckung der Östrogenrezeptoren in Mammakarzinomzellen im Jahr 1971 (Cole et al. 1971) wurde diese Beobachtung auf biochemischer Ebene bestätigt. Die spontan auftretenden Mammakarzinome entstehen vermutlich aufgrund einer Kombination aus den oben genannten Risikofaktoren und (epi-)genetischer Veränderungen. Das oben dargestellte Schema (Abb. 3) verschafft einen Überblick über die bisherigen Annahmen der Tumorentstehung, der beeinflussenden Faktoren sowie der daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen.

Histologisch gesehen sind fast alle Mammakarzinome Adenokarzinome und finden entweder duktal, also in den Epithelzellen der Milchdrüse, oder lobulär, in den Epithelzellen der Drüsenläppchen, ihren Ursprung. Bei Vorliegen einer atypischen Hyperplasie beträgt das absolute Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, über einen Zeitraum von 25 Jahren 30 % (Hartmann et al. 2015). Liegt eine atypische lobuläre oder duktale Hyperplasie (ALH bzw. ADH) vor, ist das Risiko einer malignen Entartung erhöht (5,1 %). Bei einer nicht invasiven Läsion, einem Carcinoma in situ, erhöht sich das Risiko sukzessive und beträgt bei einem lobulären Carcinoma in situ 6,5 % und bei einem duktalem Carcinoma in situ bereits 7,2 % (Hiddemann 2010). Ebenfalls ist inzwischen die Charakterisierung des Mammakarzinoms über den Östrogen-, Progesteron- und Her2/neu-Rezeptorstatus von Bedeutung und findet in Unterabschnitt 2.3.3 genauere Erklärung. Die sogenannten Triple-negativen Mammakarzinome sind wiederum eine sehr heterogene Gruppe. Zum einen werden sie immunhistologisch durch ihre Rezeptornegativität definiert. Zum anderen gehören die sog. basal-like Mammakarzinome zu dieser Gruppe, die molekulargenetisch ein ähnliches Genexpressionsprofil wie myoepitheliale Zellen der Mamma ausweisen (Kaufmann 2011).

1.3.3 Klinisch relevante prognostische Faktoren und ihre therapeutische Bedeutung

Intensive Forschungen, besonders in Bezug auf die regulatorischen Mechanismen in und um die Brustkrebszelle, brachten bis dato eine prognostische Relevanz von über 100 unterschiedlichen Molekülen hervor (Kaufmann 2011). Letztlich sind davon aktuell drei von sowohl klinischer als auch therapeutischer Bedeutung.

Steroidhormonrezeptoren liegen als Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma vor und wandern bei Aktivierung in den Zellkern (z. B. Östrogenrezeptoren $ER\alpha$, $ER\beta$). Die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM, z.B. Tamoxifen oder Raloxifen) und Aromatasehemmer (Anastrozol, Letrozol) werden zur hormonellen Tumorthherapie und zur Rezidivprophylaxe angewendet. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen der SERM erklärt man sich durch eine ungleiche Verteilung von $ER\alpha$ und $ER\beta$ bzw. der Koaktivatoren bzw. -inhibitoren in den Geweben.

Die Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) besteht aus transmembranären Glykoproteinen mit einer intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität. Sie umfasst folgende Entitäten: EGFR1/HER1 (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Der EGFR wird in 30–60 % aller invasiven Mammakarzinome vermehrt exprimiert. Die Liganden Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming

Growth Factor α (TGF- α) binden an den extrazellulären Teil des Rezeptors und aktivieren diesen. Eine Hochregulation des EGFR wird mit diversen Tumorarten assoziiert. Bestimmte monoklonale Antikörper (z. B. Cetuximab) oder auch Tyrosinkinaseinhibitoren (z. B. Gefitinib, Erlotinib) werden inzwischen therapeutisch angewendet. Die genaue prognostische Bedeutung des EGFR in Bezug auf Tumorprogression oder -ausbreitung wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Murray et al. 1993; Toi et al. 1990). Der Her2/neu-Rezeptor ist verwandt mit dem EGFR, seine extrazelluläre Bindungsregion ähnelt jener des EGFR jedoch nur entfernt. Eine Überexpression des Her2/neu-Rezeptors bei Brustkrebspatienten ist mit diversen negativen prognostischen Parametern wie z. B. einer erhöhten Anzahl befallener Lymphknoten, einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie mit einer verkürzten Lebenszeit assoziiert (Hiddemann 2010). Eine Überexpression des Gens kann bei ca. 20–30 % der invasiven Mammakarzinome beobachtet werden, was eine Rolle bei der Tumorentstehung und -progression impliziert (Slamon et al. 1987). Sie bewirkt eine Produktion von bestimmten Signalmolekülen, die wiederum über den Ras-MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase-Weg einen stimulierenden Einfluss auf das Zellwachstum haben und über den mTOR(mechanistic Target of Rapamycin)-Signalweg die Initialisierung der Apoptose inhibieren (Hudis 2007; Oda et al. 2005). Eine Bestimmung des Her2/neu-Rezeptorstatus ist sowohl von hoher prognostischer als auch von enormer therapeutischer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen Her2/neu und CRIP1 untersucht.

Das p53-Protein ist ein Tumorsuppressorgen, das in zahlreichen Tumoren inaktiviert ist. Es wurde 1992 erstbeschrieben und als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane 1992). Physiologisch ist es bei vorangegangenen zytotoxischen Einwirkungen mit irreparablen DNA-Schäden für die Apoptoseinduktion zuständig. Eine Mutation des p53-Gens und der daraus resultierende Funktionsverlust des p53-Proteins scheinen mit einer unkontrollierten Zellproliferation, dem Verlust der Apoptosefähigkeit und mit genetischer Instabilität der Zelle einherzugehen. Das veränderte p53-Protein kann aufgrund einer Akkumulation im Zellkern immunhistochemisch nachgewiesen werden und wird mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Greenblatt et al. 1994). Beim Mammakarzinom wird der Funktionsverlust des p53-Proteins zudem überwiegend in fortgeschrittenen Stadien beobachtet. Ein Nachweis hat zudem Konsequenzen für die Strahlen- und Chemotherapie.

1.3.4 Rezeptoren und ihre Antikörper

Durch Wissen über die genaue molekulare Struktur und die Funktionsweise der Wachstumsfaktorrezeptoren erschlossen sich neue therapeutische Möglichkeiten bei Patienten mit Her2/neu-positivem Rezeptorstatus. Der Ligand Heregulin, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde erstmals 1992 entdeckt (Holmes et al. 1992). Die Familie der Hereguline umfasst HRG-1 bis -4. Eine Dysbalance zwischen den Liganden und ihrem Rezeptor wird in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Tumoren gebracht (Breuleux 2007). Gleichzeitig korreliert eine Überexpression von Heregulin mit einer schlechten Prognose. Der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Tykerb, Tyverb, GlaxoSmithKline), ebenfalls in dieser Arbeit verwendet, bindet hingegen intrazellulär an die enzymatische Einheit des EGFR bzw. des Her2/neu-Rezeptors und verhindert somit eine Signalweiterleitung (Nelson und Dolder 2006). Zur Vollständigkeit und aufgrund der wichtigen therapeutischen Bedeutung sei hier weiterhin Trastuzumab erwähnt, auch bekannt unter dem Handelsnamen Herceptin (Hersteller Roche). Trastuzumab ist ein rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper, der extrazellulär an den Rezeptor bindet und ihn damit inhibiert (Hiddemann 2010). Er ist für die Behandlung des metastasierten Her2/neu-positiven Mammakarzinoms zugelassen und führt auch in der adjuvanten Therapie zu einer verbesserten Prognose (Jelovac und Wolff 2012; Smith et al. 2007).

1.4 Das Zervixkarzinom

Weltweit erkrankten im Jahr 2012 mehr als 527 000 Frauen am Zervixkarzinom. In Deutschland erkrankten jedes Jahr über 4000 Frauen an Gebärmutterhalskrebs (siehe Tab. 3). In Westeuropa ist das invasive Zervixkarzinom das siebthäufigste Malignom der Frau (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Krebs in Deutschland 2009/2010 2013). Nach der International Agency for Research into Cancer (IARC), die im Auftrag der WHO statistische Daten weltweit erfasst, steht das Zervixkarzinom an dritter Stelle und stellt die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar. Beim Vergleich der weltweiten Zahlen fällt auf, dass die Inzidenz in Entwicklungsländern deutlich zunimmt. Rund 85 % der Erkrankungen betreffen Länder mit mittlerem und niedrigem Bruttoinlandsprodukt, wie z. B. Länder in Ost-, Mittel- und Südafrika (<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>). Hier ist das Zervixkarzinom die häufigste Form der Krebserkrankungen bei Frauen. Es gilt inzwischen als bewiesen, dass eine sexuell übertragene Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) als kausaler Faktor bei der Entstehung eines Zervixkarzinoms beteiligt ist (Walboomers et al. 1999); in fast 100 % aller Zervixkarzinome

ist das HPV nachweisbar (Saslow et al. 2012). Seitdem es möglich ist, eine HPV-Infektion mithilfe eines zervikalen Abstrichs (Traut und Papanicolaou 1943) sowie eines Screenings auf Dysplasien bereits im frühen Erwachsenenalter nachzuweisen, ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms in den westeuropäischen Ländern deutlich zurückgegangen (Bartram et al. 2010). Variierende Zahlen bezüglich der Inzidenz und Mortalität im Vergleich mit anderen Ländern oder sogar Ethnizitäten lassen sich demnach vor allem auf die Anwendung von Screeningverfahren in höher entwickelten Industrienationen, aber auch auf eine erhöhte Risikoexposition und unterschiedliche Lebensart in weniger gut entwickelten und medizinisch schlechter versorgten Ländern zurückführen. Die HPV-Infektionsrate ist zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr am höchsten (Bartram et al. 2010), das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose Zervixkarzinom beträgt jedoch 49 Jahre (National Cancer Institute 2015). Frauen mit Zervixkarzinom, die unter 40 Jahren diagnostiziert werden, haben eine fast 90%ige Überlebensrate (Cancer Research UK 2014). Entscheidend hierbei ist, dass sich der Tumor auf die Zervix beschränkt. Die Zeitspanne der Entwicklung einer Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom kann danach bis zu Jahrzehnten betragen (Lowy et al. 2008). Ist der Tumor fortgeschritten, reduziert sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 50–70 % (Matsuo et al. 2014).

Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Gebärmutterhalskrebs für Deutschland, ICD-10C53

	2011	2012	Prognose für 2016
	Frauen	Frauen	Frauen
Neuerkrankungen	4.720	4.640	4.300
rohe Erkrankungsrate ¹	11,5	11,3	10,4
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	9,4	9,3	8,5
mittleres Erkrankungsalter ³	54	53	
Sterbefälle	1.626	1.617	
rohe Sterberate ¹	4,0	3,9	
standardisierte Sterberate ^{1,2}	2,6	2,6	
5-Jahres-Prävalenz	18.200	17.900	
	nach 5 Jahren	nach 10 Jahren	
absolute Überlebensrate (2011–2012) ⁴	65 (60–71)	58 (55–65)	
relative Überlebensrate (2011–2012) ⁴	68 (62–74)	65 (60–71)	

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

(Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Krebs in Deutschland 2009/2010 2013) Copyright ©Robert Koch-Institut, mit freundlicher Genehmigung.

Die HPV-Familie umfasst mehr als 100 Subtypen. Vor allem die Subtypen der Hochrisikogruppen HPV 16 und HPV 18 können im Falle einer persistierenden Infektion die Entstehung eines Zervixkarzinoms bewirken. Weitere Risikofaktoren sind u. a. Rauchen, eine frühe sexuelle Aktivität, ein schwaches Immunsystem und anderweitige Infektionen mit sexuell übertragbaren Krankheiten. Die wichtigsten präventiven Maßnahmen bezüglich des Zervixkarzinoms sind daher die Erkennung von frühen Dysplasien mit den bisher etablierten Screeningverfahren wie dem Pap-Abstrich, die Testung auf HPV und die Kolposkopie mit Biopsie und gegebenenfalls Exzision des betreffenden Schleimhautareals (Loop electrical excision procedure – LEEP). Jedoch soll hier auch auf die Möglichkeit des Screenings mit Biomarkern hingewiesen werden, worauf in Unterabschnitt 1.4.3 genauer eingegangen wird. Weiterhin besteht seit 2005 die Möglichkeit einer Impfung gegen HPV. Die deutsche Ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt die HPV-Impfung zurzeit für Mädchen zwischen 9 und 14 Jahren. Nicht jede HPV-Infektion führt zu einer Dysplasie (Zhang et al. 2014). Nahezu jede Frau kommt im Laufe ihres Lebens mit dem HPV in Kontakt. Die Infektion verläuft meist symptomfrei, kann jedoch auch – im Falle einer Infektion mit Low-risk-HPV-Viren – mit der Manifestation von Genitalwarzen oder dem Auftreten von Schleimhautläsionen einhergehen, die z. B. mit Essigsäure darstellbar sind. Die meisten Infektionen heilen folgenlos aus. Die Verwendung von Kondomen kann die Infektionsrate reduzieren (Moscicki et al. 2012). Die Unterteilung der Dysplasien erfolgt meist histologischer Art in zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN I–III). Die eher im angloamerikanischen Sprachraum verwendete Bethesda-Klassifikation unterteilt in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) und high-grade intraepithelial lesions (HSIL). Dabei umfassen die LSIL die CIN-I-Läsionen und HPV-Veränderungen, die HSIL wiederum die CIN-II- und -III-Läsionen. Der histologische Nachweis, vor allem der CIN-I-Läsion, ist schlecht zu reproduzieren. Hilfreich ist daher z. B. die Bestimmung des Biomarkers p16, eines zyklinabhängigen Kinasefaktors, der auf eine Störung des Retinoblastomprotein-Signalwegs durch die HPV-Infektion hinweist (Moscicki et al. 2012).

1.4.1 Anatomie der Cervix uteri und Pathogenese des Zervixkarzinoms

Um die Entstehung des Zervixkarzinoms zu verstehen, ist die Kenntnis der Anatomie der Cervix uteri Voraussetzung. Als Cervix uteri wird der distale Teil des Uterus bezeichnet, der durch den Corpus uteri (kranial) und durch die Vagina (kaudal) begrenzt wird. Es handelt sich hierbei um einen Bereich von lediglich 3 cm Länge und ca. 2,5 cm Durchmesser. Die

Ektozervix, auch Portio uteri genannt, besteht aus unverhorntem geschichtetem Plattenepithel, die Endozervix wiederum aus einreihigem, hochprismatischem Zylinderepithel. An der sogenannten Junctionszone treffen die beiden Epithelien aufeinander.

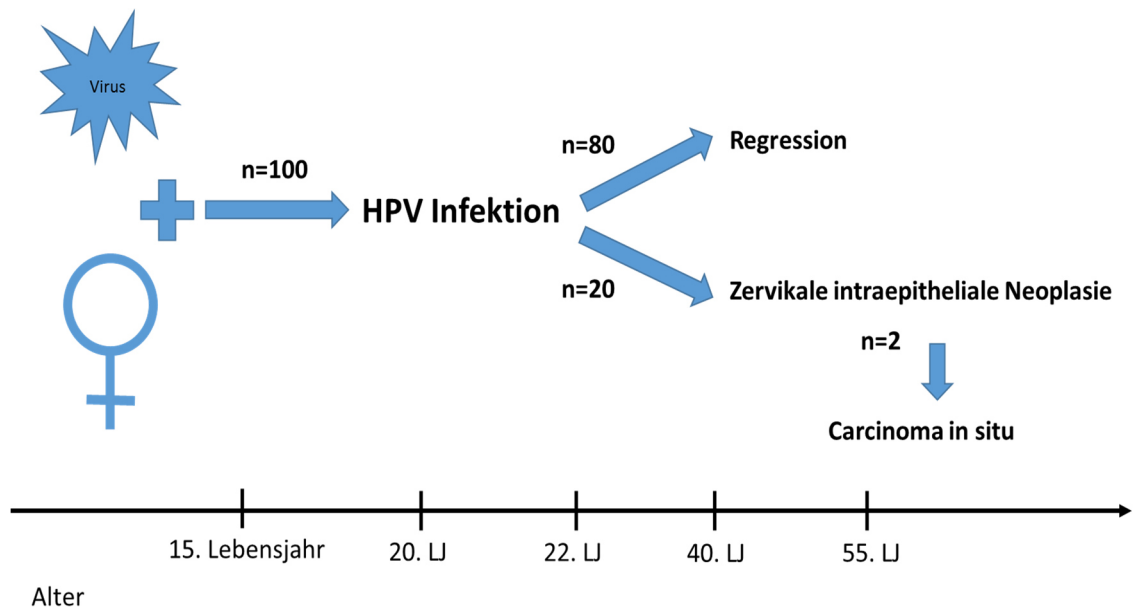


Abb. 4: Flussdiagramm zur Entwicklung der HPV-Infektion in der Cervix uteri erstellt nach Bartram et al. 2010. Copyright ©Axel Springer GmbH, mit freundlicher Genehmigung.

Hervorzuheben ist die Transformationszone, die die häufigste Lokalisation der Entstehung von intraepithelialen Neoplasien darstellt. Diese Zone entsteht dadurch, dass sich die Junctionszone im Laufe des Lebens (Pubertät, Schwangerschaft, Menopause) verschiebt, und ist charakterisiert durch eine unreife Plattenepithelmetaplasie (<http://www.eurocytology.eu>). Der häufigste histologische Typ des Zervixkarzinoms ist demnach das Plattenepithelkarzinom. Der gängigen Lehrmeinung nach entsteht ein Zervixkarzinom in vier Stufen (siehe hierzu Abb. 4). Am Anfang steht der Kontakt mit dem Virus, die initiale Infektion. Darauf folgen die persistierende Infektion, die sog. Viruspersistenz, die Progression der infizierten Zellen zur Krebsvorstufe und letztlich die Entwicklung zu Zellen eines invasiven Karzinoms (Bartram et al. 2010). Entscheidend dabei ist, dass das HPV sein Genom in die infizierte Wirtszelle integriert.

1.4.2 Molekularer Mechanismus der Zelltransformation beim Zervixkarzinom

Das HPV besitzt eine ringförmige, doppelsträngige DNA, die für 8-9 Proteine kodiert (E1–7, L1–2). Es wird davon ausgegangen, dass bestimmte virale Onkoproteine (E6 und E7) die Tumorsuppressorproteine p53 und pRB (Retinoblastom-Protein) inaktivieren. Die Expression und Funktion des pRB wird im Wesentlichen durch die Interaktion mit der sog.

E2F-Transkriptionsfaktorfamilie, insbesondere E2Fs 1-3, gesteuert (Schaal et al. 2014). Diese Transkriptionsfaktoren werden jedoch durch die Bindung des viralen E7-Proteins an das pRB inhibiert. Zudem bewirkt eine Bindung von E7 an Zyklinkinaseinhibitoren einen Übergang der Zelle in die Synthesephase des Zellzyklus (durch Entstehung eines inaktiven pRB-Proteins). Das E6-Onkoprotein trägt u. a. zu einer verringerten Apoptoserate bei und bewirkt eine Herabsetzung der Halbwertszeit von p53 (Stanley et al. 2007). Die viralen Proteine verhindern damit den programmierten Zelltod und ermöglichen eine ungehinderte Proliferation der Zelle. Diese sensiblen Mechanismen tragen zu einer Veränderung des Zellequilibriums bei und bewirken letztlich die Entstehung einer Dysplasie. Von einer zusätzlichen genetischen Prädisposition bei der Entstehung des Zervixkarzinoms ist auszugehen (Ghaderi et al. 2002). Welcher Polymorphismus ausschlaggebend ist, wird jedoch kontrovers diskutiert (Ressing et al. 2010).

1.4.3 Screeningverfahren und Biomarker

Das zytologische Screeningverfahren wird durch unterschiedliche Faktoren limitiert. Zum Beispiel ist es häufig mit wiederholter Testung und kostenaufwendiger kolposkopischer Probenentnahme verbunden, weshalb es in Entwicklungsländern nach wie vor problematisch ist, flächendeckende Screeningverfahren zu etablieren. Weiterhin hat z.B. der Pap-Test eine niedrige Sensitivität (60–70 %) und, bedingt durch die subjektive Beurteilung des Untersuchers, eine hohe Gefahr eines falsch-negativen Ergebnisses (Sahasrabuddhe et al. 2011). Der Nachweis der Virus-DNA erfolgt durch PCR (Polymerase Kettenreaktion). Er hat zwar eine hohe Sensitivität, aber einem niedrigen prädiktiven Wert (Sahasrabuddhe et al. 2011). Die Spezifität ist eingeschränkt, da ein Großteil der HPV-Infektionen letztlich ausheilt und nicht in einer CIN resultiert. Laut des Gemeinsamen Bundesausschusses (G-BA), der 2013 das „Gesetz zur Entwicklung der Krebsfrüherkennung und zur Qualitätssicherung durch klinische Krebsregister“ (KFRG) verabschiedete soll aktuell ab einem Alter von 35 Jahren eine Kombinationsuntersuchung (Pap-Test und HPV-Test) in Abstand von 3 Jahren erfolgen. Bisher wurde eine jährliche zytologische Untersuchung empfohlen und nur bei einem auffälligen Pap-Test eine weitere Testung auf HPV durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion ist in jungen Jahren signifikant höher. Sie verläuft meist unkompliziert und selbstlimitierend. Die alleinige Testung auf HPV wäre daher obsolet, insbesondere weil eine Infektion mit dem Virus kein Vorhandensein einer CIN voraussetzt. Der G-BA sieht ab dem Jahr 2018 ein flächendeckendes Screeningprogramm mit der Kombination aus Pap- und HPV-Test für alle Frauen vom 20.-60. Lebensjahr in Abstand von 5 Jahren vor.

Es gibt zahlreiche Studien, die den Zusammenhang des Zervixkarzinoms mit bestimmten prognostischen Markern beschreiben. Untersucht wurden u. a. der Nachweis der HP-Viren selbst, aber auch immunologische Faktoren, Antigene, Onkogene, Wachstumsrezeptoren und Wachstumsfaktoren. Das tumorassoziierte Antigen TA-4 ist spezifisch für das Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri (*squamous cell carcinoma* – SCC) und gibt Aufschluss über die Tumorausbreitung, das Rezidivrisiko und über die Möglichkeit von Lymphknotenmetastasen (Molina et al. 2005; Hiddemann 2010). Beim Adenokarzinom wiederum ermöglichen sowohl das karzinoembryonale Antigen (CEA) als auch das CA 125 eine Aussage über die Überlebensrate, vor allem im Zusammenhang mit dem prä- und dem postoperativen Serumspiegel (Niloff et al. 1984; Leminen 1990). Ein erhöhter EGFR-Gewebespiegel geht mit einem erhöhtem Rezidivrisiko einher (Pfeiffer et al. 1989). Zum Screening eignen sich die genannten Marker jedoch nicht. Neuere Verfahren, wie z. B. die Bestimmung der E6-/E7-mRNA (*messenger ribonucleic acid*) und des zyklinabhängigen Kinasefaktors p16, sind bereits kommerziell erhältlich (Sahasrabudde et al. 2011). Dies sind nur einige Beispiele; eine vollständige Zusammenfassung aller bekannten prognostischen Faktoren ist für diese Arbeit nicht relevant. Hervorzuheben ist jedoch, dass es bisher keine einfache und kostengünstige Testung mit adäquat hoher Sensitivität gibt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war u. a. die Klonierung von LDOC1 zur weiteren Expressionsanalyse in Zervixkarzinomzellen. Die DNA-Methylierung bzw. das Methylierungsmuster ist aktuell im Fokus zahlreicher Forschungsprojekte, die auf der Suche nach einem klinisch anwendbaren Biomarker sind (Sahasrabudde et al. 2011). Unsere Arbeitsgruppe führte im Anschluss an diese Arbeit u. a. eine Methylierungsanalyse des LDOC1-Promotors in Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien durch (Buchholtz et al. 2013). Spezifische Methylierungsmuster könnten in Zukunft eine Möglichkeit zur Detektion von Tumoren bzw. Tumorstufen darstellen.

1.5 LDOC1 - Struktur, Funktion, Regulation und Vorkommen

LDOC1, bestehend aus nur 146 Aminosäuren (17 kDa) und auf der Xq27-Bande des X-Chromosoms lokalisiert, verfügt über die namensgebende bZIP-Domäne (*basic leucine zipper domain*) und eine Prolin-reiche Region (Nagasaki et al. 1999). LDOC1 wurde erstmalig 1999 in Zellen des Pankreas- und Magenkarzinoms beschrieben (Nagasaki et al. 1999). Im Vergleich zu normalem Gewebe, in dem das Protein ubiquitär vorkommt, konnte man im maligne veränderten Gewebe eine verminderte Expression von LDOC1 beobachten. Diese verminderte Expression wurde weiterhin auch in Zellen des Ösophaguskarzinoms und

mehrerer Leukämieformen festgestellt (Ogawa et al. 2008; Duzkale et al. 2011). LDOC1 könnte demnach eine Rolle als Tumorsuppressorgen in der Entstehung bzw. Entwicklung maligner Entartungen spielen.

1.5.1 LDOC1 im Zusammenhang mit Onkogenese und als möglicher prognostischer Faktor

Der Bereich, auf dem LDOC1 lokalisiert ist, wurde als eine Region mit segmentalen Duplikationen identifiziert (Sharp et al. 2005), die anfällig für genetische Veränderungen sind (Kouprina et al. 2005). Erst kürzlich wurde zudem entdeckt, dass die Expression von LDOC1 durch DNA-Methylierung beeinflusst wird (Lee et al. 2013a). Die DNA-Methylierung ist wie oben beschrieben ein epigenetischer Prozess, bei dem Methylgruppen an bestimmte DNA-Regionen gebunden werden und damit die Transkription bestimmter Gene verändern. Lee et al. beschreiben den Zusammenhang der Hypermethylierung der Promotorregion des LDOC1-Gens mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx. LDOC1 wird in diesen Tumoren als epigenetisch verändertes, stumm geschaltetes Tumorsuppressorgen auf dem X-Chromosom identifiziert. In vivo und in vitro konnte in Verbindung mit ektopischer LDOC1-Genexpression eine wachstumshemmende Wirkung auf die Tumorzellen beobachtet werden. Durch Promotormethylierung erfolgte eine verminderte Expression von LDOC1. Eine wiederhergestellte Expression des Gens resultierte laut Lee et al. in einer Suppression des NF-kappa-B(*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalwegs, der meist in den Tumorzellen hyperaktiviert ist. Diese Beobachtung wurde an Pankreaskrebszelllinien bestätigt (Nagasaki et al. 2003). Somit betrachten die Forscher den Prozess der Promotormethylierung als kritisches Moment in der Tumorentstehung. LDOC1 könnte in Zukunft als Biomarker bzw. prädiktiver Marker von Bedeutung sein. Im Rahmen dieser Arbeitsgruppe wurde die Wirkung einer LDOC1-Überexpression in transfizierten Zervixkarzinomzelllinien untersucht.

1.6 CRIP1 - Struktur, Funktion, Regulation und Vorkommen

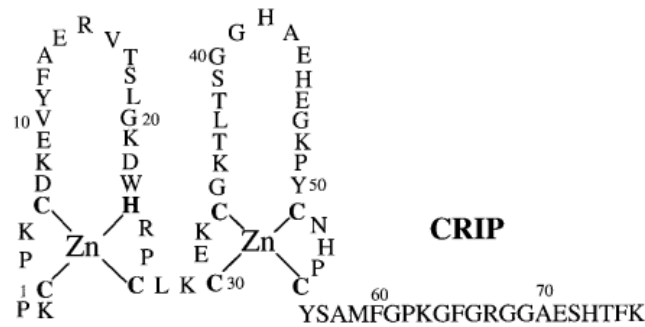


Abb. 5: Aminosäuresequenz des *cysteine-rich intestinal protein* in Mäusen (Pérez-Alvarado et al. 1996). Copyright ©Elsevier Verlag, mit freundlicher Genehmigung.

Die cDNA des *cysteine-rich intestinal protein* wurde zum ersten Mal in Dünndarmzellen von Mäusen identifiziert (Birkenmeier und Gordon 1986). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine unterschiedlich hohe Konzentration von CRIP während der Neonatalperiode festgestellt. Zudem variierte die Expression in erwachsenen Mäusen abhängig vom Gewebe, wobei die höchsten Konzentrationen im Dünndarm und im Colon gemessen wurden. Außerdem konnte durch einen Vergleich der Struktur mit der Struktur anderer bekannter Proteine angenommen werden, dass CRIP ubiquitär in Wirbeltieren vorkommt.

Weitere Forschungen implizierten eine Rolle von CRIP im intrazellulären Zinktransport (Hempe und Cousins 1991; 1992) und in der zellulären Immunabwehr (Cousins und Lanningham-Foster 2000a; Lanningham-Foster et al. 2002). Im Jahr 1997 wurde erstmals die cDNA des humanen CRIP (CRIP1, hCRIP) isoliert (Khoo et al.). Dieses unterscheidet sich von dem in Mäusen und Ratten isolierten CRIP durch zwei Aminosäuresequenzen und ist ein kleines Protein mit einer Masse von 8390 Da. Das Gen CRIP1 befindet sich auf einer subzentromer gelegenen Region des q-Arms von Chromosom 7 (Garcia-Barcelo et al. 1998).

Das Entschlüsseln der molekularen Struktur macht es möglich, weitere Annahmen über die Funktion von CRIP1 im Zellorganismus zu stellen. CRIP1 ist Mitglied der Zinkfingerproteinfamilie (Hao et al. 2008). Diese Proteine beinhalten mindestens eine Zinkfingerdomäne mit einem gebundenen Zinkion und besitzen dadurch eine schleifenartige Struktur (vgl. Abb. 6). CRIP1 im Speziellen gehört zur sogenannten LIM/double-zinc-finger-Familie. LIM-Domänen sind nach den Proteinen benannt, in denen sie zum ersten Mal entdeckt wurden: Lin11, Isl-1 und Mec-3.

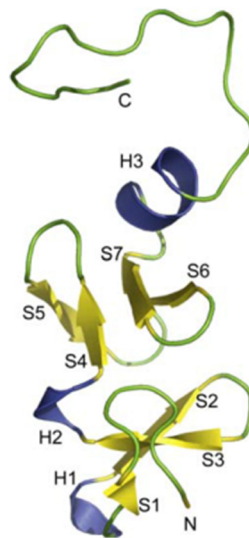


Abb. 6: Strukturmodell von CRIP1 mit zwei LIM-Domänen und einem C-terminalen Loop (Hao et al. 2008).

Es handelt sich dabei um Strukturdomänen mit zwei benachbarten Zinkfingern, im Falle von CRIP1 mit Wiederholungen von Histidin- und Cystein-Sequenzen (Dawid et al. 1998; Cousins und Lanningham-Foster 2000). Die molekularbiologische Stabilität der Zinkfingerdomäne erlaubt es diesem Proteinabschnitt, mit Nucleinsäuren zu interagieren, und macht diese Sorte von Proteinen häufig zu Transkriptionsfaktoren (Jurata et al. 1996). Sie scheinen aber auch eine Rolle in der Zelladhäsion, der Zellmotilität und in der Signaltransduktion zu spielen. Außerdem sollen sie an der Kommunikation zwischen Zytosol und Nukleus beteiligt sein (Kadmas und Beckerle 2004) und das Wachstum sowie die Differenzierung einer Zelle beeinflussen (Lanningham-Foster et al. 2002). Unsere Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass CRIP1 bevorzugt am Golgi-Apparat und nicht im Zellkern lokalisiert ist, was eher auf eine Rolle bei der auto- oder parakrinen Signaltransduktion hinweist.

1.6.1 CRIP1 im Zusammenhang mit Onkogenese und als möglicher prognostischer Faktor

Aktuelle Untersuchungen zeigen eine Überexpression von CRIP1 in mehreren Krebszellarten, u. a. in Brustkrebs- und Zervixkarzinomzellen sowie in Prostata-, Pankreas- und Kolorektalkarzinomzellen (Ma et al. 2003; Liu et al. 2004; Chen et al. 2003; Wang et al. 2007; Groene et al. 2006; Terris et al. 2002). Eine Untersuchung der CRIP1-Expression in Tumorgewebe im Vergleich mit gesundem Brustgewebe zeigte eine 8–10-fache Überexpression der mRNA in ca. 90 % der invasiven und duktalen Mammakarzinome (Ma et al. 2003). Beim Zervixkarzinom konnte eine bis zu 100-fache Überexpression verglichen mit normalen Zervixzellen beobachtet werden (Santin et al. 2005). Somit wird die Möglichkeit diskutiert,

CRIP1 als Biomarker in der Krebsfrüherkennung und in der Prognoseerfassung zu verwenden. Bisher ist jedoch nach wie vor wenig bekannt über die genaue Funktion des Proteins oder seine mögliche Rolle als prognostischer Faktor. In Bezug auf Brustkrebs wurde CRIP1 mit dem brustkrebsassoziierten Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu in Verbindung gebracht. In Brustkrebszellen, die Her2/neu überexprimieren, ist auch eine Hochregulation der CRIP1-Expression zu beobachten (Mackay et al. 2003b). Die Korrelation von CRIP1 und Her2/neu wurde weiterhin mithilfe von Massenspektrometrie, dem sog. MALDI (*Matrix-assisted laser desorption Imaging*) untersucht (Rauser et al. 2010; Ludyga et al. 2013). Hierbei wurde ein positiver Zusammenhang zwischen einer erhöhten CRIP1-Expression und einer besseren Prognose im Krankheitsverlauf nahegelegt. Eine bessere Prognose im Zusammenhang mit einer erhöhten CRIP1-Expression wurde auch in Bezug auf Osteosarkome beobachtet (Baumhoer et al. 2011). Beim Magenkarzinom wiederum wird CRIP1 als unabhängiger prognostischer Faktor für ein verkürztes Überleben beschrieben (Balluff et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde u. a. versucht, auf molekularbiologischer Ebene eine Korrelation von CRIP1 und Her2/neu in Brustkrebszelllinien nachzuweisen sowie – unabhängig davon – weitere Einsichten in die Funktion von CRIP1 bei gynäkologischen Tumoren zu gewinnen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

- Brutschrank, HERAcell 150i CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- Elektrophoresespannungsstromquelle, E-Gel Power Base (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- FACS-Gerät, FACScan Fluorescence Activated Cell Analyze (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).
- Kühlschrank (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland)
- MicroPulser Electroporator (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Mikroskop, Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit Anregungsfilter/Excitation Filter, Wellenlänge 460 nm
- Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Präzisionswaage, Mettler Delta Range (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)
- Programm „Quantity One“ für qualitative DNA-Auswertungen
- Schüttler, Vibrax Serono Shaker (EMD Serono Inc., Rockland, USA)
- Standard-PCR-Gerät, Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Sterilbank, Laminar-Air-Flow-Sterilbank HERA Safe (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- Stickstofftank (Linde AG, Pullach, Deutschland)
- Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterialien

- BlueJuice Gel Loading Buffer (10x) (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- 96-Well-Platten (VWR, Ismaning, Deutschland)
- Deckgläser für Mikroskopie, 24 × 24 mm (Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

- DNA-Marker, pBR 328 Mix I (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- DNA-Leiter, DNA-Ladder (NewEngland BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)
- E-Gel 2 % with SYBR Safe (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Gefriercontainer, Mr. Frosty Freezing Container, Nalgene (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Kryoröhrchen (1,5 ml) (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Kulturflaschen, 25 cm² (IWAKI & Co., LTD., Tokyo, Japan)
- Objektträger 76 × 26 × 1 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Objektträger, Lab-Tek II Chamber Slide™ System 4 Well Glass Slide (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Petrischalen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipetten (1000 µl, 200 µl, 10 µl) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen, SafeSeal-Tips Premium (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Safe-Lock-Gefäß (1,5 ml) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Spritze (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Zellkulturgefäß, quadriPERM (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

- Adenosin-5'-triphosphat, ATP (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Agar, Select Agar Powder (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- BME, 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Desoxyribonukleosidtriphosphate, PCR Nucleotide Mix, bestehend aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Destilliertes Wasser (Noll, München, Deutschland)
- DEPC, Diethylpyrocarbonat (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

- Dexamethason-Lösung, 1,0 mg/ml Methanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- DMSO, Dimethylsulfoxid (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Einfriermedium (ibidi GmbH, München, Deutschland)
- Ethanol 75 % (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- Isopropylalkohol ROTISOLV $\geq 99,95$ % LC-MS-Grade (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich)
- LB-Medium, Lennox (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Lipofectamin 2000 transfection reagent (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat, ≥ 99 % Zellkulturqualität (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol, $\geq 99,98$ % Rotisolv Ultra LC-MS Methylalkohol (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- M-MLV RT(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega, Mannheim, Deutschland)
- M-MLV RT(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)-Reaktionspuffer (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Nucleasefreies Wasser (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- PBS (*Phosphate Buffered Saline*), Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca^{2+} & Mg^{2+} (PAA, Pasching, Österreich)
- pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektor (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- PCR Master Mix, bestehend aus Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl_2 , Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Pferdeserum (PAA, Pasching, Österreich)
- Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Mannheim, Deutschland)
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Serumfreies Medium (PAA, Pasching, Österreich)
- SYBR Green PCR Master Mix, eine Kombination aus SYBR Green I dye, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und Puffer (Applied Biosystems, Waltham, USA)
- TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (1x) (PAA, Pasching, Österreich)

- Tumorzellmedium, Quantum Tumor 263 for Tumor cells with L-Glutamine (PAA, Pasching, Österreich)
- Tween 20, Polysorbat 20 (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

2.4 Medikamente

- Ampicillin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Heregulin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Lapatinib (Tykerb/Tyverb, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland)
- Geneticin/G418 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA, Pasching, Österreich)
- Zebularin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

2.5 Antikörper

- Alexa Fluor 488-konjugiertes Ziegen-anti-Kaninchen Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Cy(Cyanin)3-konjugierter-Ziegen-anti-Maus/anti-Kaninchen Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Her2/neu-Antikörper (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- Maus-anti-V5-tag-Antikörper (AbD Serotec, Puchheim, Deutschland)
- Monoklonaler Histon-H1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper anti-CRIP1 (Prof. Axel Walch, Helmholtzzentrum Neuherberg, TU München)

2.6 Oligonukleotide und Primer

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' zu 3'
β-Actin forward	GGAGAAGCTGTGCTACGTCG
β-Actin reverse	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT
β-Actin qPCR Probe	FAM-TCCTTCCTGGGCATGGAGTC-TAMRA
CRIP1 forward	CTGCACCGGACCCGGAGC
CRIP1 reverse	CTTGAAAGTGTGGCTCTCGG
CRIP1 Full-Length-Primer mit Stoppcodon	TTACTTGAAAGTGTGGCTCTCGG
CRIP1 qPCR Probe	FAM-GGAGGTGTACTTCGCCGAGAGGG-TAMRA
Her2/neu forward	CCCAGCCTGAATATGTGAACC
Her2 reverse	GACACATCAGGGCTTCTGCG
LDOC1 forward	CGCAATGGTGGATGAGTTGG
LDOC1 reverse	ATAATCATCCTCCTCTTCTTCGTCG
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Obige Primer, als auch synthetische Oligo(dT)-Nukleotid-Primer wurden von der Firma Biomers (biomers.net, Ulm, Deutschland) bezogen.

2.7 Gensequenzen LDOC1 und CRIP1

Sequenz LDOC1 ohne Introns

CGAACCGAGCCGAGTCCTGTCCTTCCAGGCCGTTCGCA**ATGGTGGATGAGTTGGT**
 GCTGCTGCTGCACGCGCTCCTGATGCGGCACCGCGCCCTGAGCATCGAGAACAGC
 CAGCTCATGGAACAGCTGCGGGCTGCTGGTGTGCGAGAGGGCCAGCCTGCTGCGCC
 AGGTACGTCCGCCGAGCTGCCCGGTGCCCTTCCCCGAAACGTTTAATGGCGAGAG
 CTCCCGGCTCCCGAGTTTATCGTGCAGACGGCGTCTTACATGCTCGTGAACGAGA
 ACCGATTCTGCAACGACGCCATGAAGGTGGCATTTCCTAATCAGCCTCCTCACCGGG
 GAAGCCGAGGAGTGGGTGGTGCCCTACATCGAGATGGATAGCCCCATCCTAGGTG
 ATTACCGGGCCTTCCTCGATGAGATGAAACAGTGCTTTGGCTGGGATGACGACGAA
 GACGACGACGACGAAGAAGAGGAGGATGATTAT**TAG**

Sequenz CRIP1 ohne Introns

GCCCGTGCCGCCCCAGCCGCTGCCGCCTGCACCGGACCCGGAGCCGTC**ATGCCCAA**
 GTGTCCCAAGTGCAACAAGGAGGTGTACTTCGCCGAGAGGGTGACCTCTCTGGGC
 AAGGACTGGCATCGGCCCTGCCTGAAGTGCGAGAAATGTGGGAAGACGCTGACCT
 CTGGGGGGCCACGCTGAGCACGAAGGCAAACCCTACTGCAACCACCCCTGCTACGCA
 GCCATGTTTGGGCCTAAAGGCTTTGGGCGGGGCGGAGCCGAGAGCCACACTTTCA
AGTAAACCAG

- **Rot** \triangleq Start- und Stopcodon
- Unterstrichen \triangleq full length CRIP1/LDOC1 Primer, Kloniersequenz
- **Fettdruck** \triangleq kodierender Bereich

Bei der entsprechenden Klonierungssequenz ist hervorzuheben, dass diese kurz vor dem Startcodon beginnt und das Stopcodon nicht enthält.

2.8 Komplettsysteme

- NucleoSpin RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland)
- Zytokin Array, RayBio C-Series Human Cytokine Antibody Array 6 Kit (Ray Biotech, Norcross, USA)

2.9 Epithelzelllinien

- MCF 10A (ATCC CRL-10317): nicht tumoröse humane Epithelzelllinie der Michigan Cancer Foundation aus der Brustdrüse, Expression von brustspezifischen Antigenen, sensibel auf EGF (Soule et al. 1990)
- MCF7 (ATCC HTB-22): erstmals 1973 etablierte Mammakarzinomzelllinie der Michigan Cancer Foundation (Soule et al. 1973), abgeleitet aus einem malignen Pleuraerguss eines Adenokarzinoms der Mamma
- T47D (ATCC HTB-133): humane Tumorzelllinie eines duktales Mammakarzinoms (Keydar et al. 1979)
- MDA-MB-453 (ATCC HTB-131): humane Mammakarzinomzelllinie
- MDA-MB-231 (ATCC HTB-26): humane Mammakarzinomzelllinie, Adenokarzinom
- MDA-MB-435 (ATCC HTB-131): humane Mammakarzinomzelllinie
- HBL-100 (ATCC HTB-124): humane Epithelzelllinie der Brustdrüse (Gaffney 1982)
- HeLa (ATCC CCL-2): erste permanent etablierte Zervixkarzinomzelllinie der Patientin Henrietta Lacks, Afroamerikanerin (Scherer et al. 1953)
- SiHa (ATCC HTB-35): humane Zervixkarzinomzelllinie, Plattenepithelkarzinom
- SW756 (ATCC CRL-10302): Humane Zervixkarzinomzelllinie, Plattenepithelkarzinom
- Me180 (ATCC HTB-33): humane Zervixkarzinomzelllinie, Epidermoidkarzinom
- C-33 A (ATCC HTB-31): humane Zervixkarzinomzelllinie
- CaSki (ATCC CRL-1550): humane Zervixkarzinomzelllinie, Epidermoidkarzinom
- Caco-2/TC7 (ATCC HTB-37): Zelllinie des kolorektalen Adenokarzinoms

2.10 Bakterien

Kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (Strata Clone Solo Pack competent cells, Agilent)

2.11 Zellkultivierung und Anlegen von Gefrierkulturen

Die Kultivierung der etablierten Zelllinien erfolgte nach standardisierten Bedingungen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Als Wachstumsmedium wurde Quantum 263 mit L-Glutamin verwendet.

Um adhärente Zellen für weitere Versuche abzulösen, Zellpopulationen zu verringern oder einzufrieren, wurden sie zunächst gründlich mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen, um das Nährmedium zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin hinzugefügt und je nach Zelllinie für 3–10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch zusätzliches Abschlagen und Abspülen des Bodens mit einer Pipette wurde der Ablöseprozess unterstützt. Um die Wirkung des Trypsins aufzuheben, wurde erneut Medium in ca. 5–10-facher Menge zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellkulturflaschen zur weiteren Kultivierung zurück in den Brutschrank gelegt. Um die Zellklone zu archivieren und zu einem späteren Zeitpunkt bearbeiten zu können, wurden Gefrierkulturen angelegt.

2.11.1 Materialien

- PBS
- Tumorzellmedium
- Trypsin
- Einfriermedium
- Kryoröhrchen

2.11.2 Protokoll zur Anlegung von Gefrierkulturen

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden die in einer Zellkulturflasche dicht gewachsenen Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend trypsiniert und erneut in Medium homogenisiert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1000 rpm wurde das entstandene Sediment in 800 µl Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Langzeitlagerung erfolgte nach vorübergehender Lagerung bei –80 °C in flüssigem Stickstoff.

Eingefrorene Zellkulturen wurden in den Kryoröhrchen aufgetaut und in kaltem Medium zentrifugiert. Das Sediment konnte im Anschluss erneut in Medium gegeben und für die Zellkultur genutzt werden.

2.12 RNA Isolation aus den Zellen der Zellkultur

Die mRNA einer Zelle stellt eine Momentaufnahme der Gene dar, die aktuell transkribiert werden. Die RNA-Isolation ermöglicht daher eine genauere Analyse der Genexpression einer Zelle. Wichtig hierbei ist eine rechtzeitige Denaturierung der RNasen, um einem Abbau der empfindlichen RNA entgegenzusteuern. In dieser Arbeit wurden das NucleoSpin RNA Clean-up Kit von Macherey-Nagel sowie das TRIzol Reagent verwendet, wobei nach den Herstellerangaben gearbeitet wurde. Die Basis dieser beiden Methoden ist die von Chomczynski und Sacchi beschriebene und weiterentwickelte Single-Step-Methode (siehe Präparation mit dem TRIzol Reagent) (Chomczynski und Sacchi 1987).

2.12.1 Präparationen mit dem TRIzol Reagent

Bei der RNA-Gewinnung durch das TRIzol Reagent werden durch das in dem Reagenz enthaltene Guanidiniumthiocyanat in einem Schritt die Zellen lysiert und gleichzeitig die RNasen denaturiert (sog. Single-Step-Methode). In dem zusätzlich enthaltenen Phenol löst sich die RNA. Diese Methode wird besonders zur RNA-Isolation aus Zellen oder Geweben angewendet.

2.12.2 Materialien

- TRIzol Reagent
- Chloroform
- Isopropylalkohol
- 75%iges Ethanol, gelöst in DEPC(Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser
- Nucleasefreies Wasser

2.12.3 Das TRIzol Protokoll

Je nach Art der Zellkultivierung wurden 500–1000 µl TRIzol Reagent entweder direkt auf die adhärente Zellschicht oder nach vorheriger Zentrifugation der Zellsuspension (z. B. 1200 rpm, 5 min, 4 °C) auf das Zellsediment gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde

die Lyse der Zellen unterstützt. Die Zelllysate wurden anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und waren danach zur weiteren Bearbeitung bereit oder bei einer Aufbewahrung bei -60 bis -70 °C mindestens einen Monat haltbar.

Zur weiteren Bearbeitung wurden 0,2 ml Chloroform pro ml des zuvor hinzugefügten TRIzol Reagent addiert und das geschlossene Gefäß für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt. Nach erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 2–3 Minuten wurde das Zelllysate zentrifugiert (12000 g, 15 min, 4 °C). Die daraufhin entstandene Phaseneinteilung ließ sich wie folgt interpretieren: Die obere wässrige Phase enthielt die gewollte RNA, die Phasen darunter enthielten DNA, denaturierte Proteine und andere Zellbestandteile. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 100%igem Isopropylalkohol pro Milliliter TRIzol Reagent präzipitiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur über 10 Minuten und eine erneute Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4 °C). Die RNA befand sich im Anschluss in Form eines Pellets auf dem Grund oder an der Seite des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol pro ml des zuvor verwendeten TRIzol Reagent gewaschen, nochmals zentrifugiert (7500 g, 5 min, 4 °C) und nach Entfernung des Überstands getrocknet. Die so entstandenen Sedimente wurden in 20 µl DEPC-Wasser (60 °C, 10 min) resuspendiert und bei -20 °C gelagert oder weiterverwendet.

2.13 Präparation mit dem NucleoSpin RNA Clean-up Kit

Es werden im Wesentlichen folgende Schritte durchlaufen: (1) Lyse der Zellen und Trennung der RNA von den restlichen Zellbestandteilen durch die spezifische Bindung der RNA an die Säulen, (2) Präzipitation und Waschen der RNA, (3) Auflösen der RNA in RNase-freiem Wasser.

2.13.1 Materialien

NucleoSpin RNA Clean-up Kit mit folgenden Bestandteilen:

- Lysepuffer RA1
- Waschpuffer RA2
- Waschpuffer RA3 (25 ml, es wurden 100 ml Ethanol hinzugegeben)
- Nucleasefreies Wasser
- NucleoSpin-Säulen mit RNA-Bindekapazitäten
- 2-ml und 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße

- Weitere Reagenzien und Materialien:
- Ethanol ($\geq 99,5\%$)
- BME (2-Mercaptoethanol)
- PBS
- Tischzentrifuge

2.13.2 NucleoSpin-RNA-Clean-up-Kit-Protokoll

Nach Entfernung des flüssigen Nährmediums wurden die Zellen der Zellkultur mit 300 μ l Lysepuffer von der Kulturschale gelöst. Durch Auf- und Abpipettieren wurde der Lösungsprozess unterstützt. Durch das Hinzufügen von 300 μ l 96–100%em Ethanol wurde das Lysat für die folgende RNA-Extraktion optimiert und homogenisiert. Für jede Zellreihe wurde jeweils eine NucleoSpin-Säule mit RNA-Bindekapazität verwendet. Zum Auffangen des abzentrifugierten Durchflusses wurden 2-ml-Mikroreaktionsgefäße verwendet.

Das Lysat wurde auf die Membran aufgetragen und zentrifugiert (8000 g, 30 sek.). Das Sammelgefäß wurde danach verworfen und durch ein neues Röhrchen ersetzt.

Das Waschen entfernt z. B. organische Substanzen wie Metabolite und zelluläre Komponenten. Dies geschah zunächst mit 250 μ l RA2-Puffer und erneuter Zentrifugation (8000 g, 30 sek.). Anschließend wurden 700 μ l RA3-Puffer hinzugefügt und erneut zentrifugiert (8000 g, 30 sek.). Zum Schluss des Waschvorgangs wurden 350 μ l RA3-Puffer die Membran aufgeladen und für 2 Minuten bei 8000 g zentrifugiert.

Nach Überführung der NucleoSpin-Säule in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß und Trocknung für 3 Minuten bei offenem Deckel konnte die RNA im letzten Schritt eluiert werden. Mit 60 μ l RNase-freiem Wasser wurde bei 8000 g für eine Minute zentrifugiert. Somit entstanden jeweils 60 μ l RNA-Lösung, die zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung standen.

2.14 Reverse-Transkriptase-Reaktion zur cDNA-Synthese

Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie ist der Katalysator für die umgekehrte, also reverse Transkription von RNA zu DNA. Dieser Prozess kommt weder in Eukaryoten noch in Prokaryoten vor und wurde im Jahr 1970 zum ersten Mal von Howard Temin im Rous-Sarkom-Virus entdeckt und zur gleichen Zeit von David Baltimore aus RNA-Viren isoliert und beschrieben (Temin und Mizutani 1970; Baltimore 1970). Eine Sensation war die Entdeckung der Telomerase im Jahr 1985 (Greider und

Blackburn 1985) in Eukaryoten – ebenfalls eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie befindet sich im Zellkern und kommt vor allem in rasch proliferierenden Zellen (z. B. Stammzellen, Knochenmarkszellen) vor.

Die im Labor durchgeführte Reverse-Transkriptase(RT)-Reaktion erfordert, neben dem Enzym, das Beisein von mRNA-spezifischen Primern, den sogenannten Oligo(dT)-Nukleotid-Primern. Diese sind in der Lage, an den Poly-A-Schwanz der mRNA zu binden und die reverse Transkription zu initiieren. Die entstehende DNA besteht nur noch aus Exons. Sie wird als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet. Wird die cDNA im Anschluss mittels PCR amplifiziert, ermöglicht sie die genauere Untersuchung der Genexpression verschiedener Gewebe.

2.14.1 Materialien

Insgesamt 25 µl Reaktionsansatz, verwendet für die Reverse-Transkriptase-Reaktion und die anschließende PCR:

17,25 µl mRNA-Lösung:

- 16,5 µl mRNA
- 0,75 µl Oligo(dT)-Primer, 1 µl Oligo(dT)-Primer pro 20 µl Reaktionsvolumen (Herstellerempfehlung)

7,75-µl-Reaktionsansatz:

- 5 µl M-MLV RT 5x Reaktionspuffer
- 1,25 µl PCR Nucleotide Mix
- 0,5 µl Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor
- 1 µl M-MLV RT

2.14.2 Protokoll der Reverse-Transkriptase-Reaktion

Bei der RT-Reaktion wird die mRNA zunächst durch Erhitzung des Gemischs denaturiert (70 °C). Durch anschließendes Abkühlen auf 42 °C wird die Anlagerung der (zum Poly-A-Schwanz komplementären) Oligo(dT)-Primer initiiert und die mRNA dient der DNA-Polymerase Reverse Transkriptase als Matrize zur Synthese der cDNA.

Zur Durchführung der RT-Reaktion fanden folgende Arbeitsschritte statt: Zuerst wurde ein Gemisch aus 0,75 µl 100 µM Oligo(dT)-Nukleotiden und 16,5 µl mRNA in einem

Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert (5 min, 70 °C) und anschließend auf Eis gelegt. Dadurch erfolgte zunächst die Denaturierung der mRNA und die erneute Bildung einer Sekundärstruktur wurde verhindert. 5 µl M-MLV RT 5x Reaktionspuffer, 1,25 µl dNTP-Mischung, 0,5 µl Recombinant RNasin Ribonuklease-Inhibitor und 1 µl M-MLV RT wurden unter Kühlung hinzugegeben und vermengt. Verwendet wurde hier die M-MLV-Reverse-Transkriptase, da sie sich als Enzym der Wahl bei längeren mRNA-Strängen erwiesen hat. Bei anschließender Inkubation (60 min, 42 °C) erfolgte die cDNA-Synthese. Die cDNAs der Zelllinien wurden bis zur weiteren Verwendung bei –18 °C aufbewahrt.

2.15 Polymerase Kettenreaktion

Die PCR dient der gezielten exponentiellen Vervielfältigung bestimmter Genabschnitte und ermöglicht deren Nachweis und weitere Untersuchung (Mullis 1990).

Bei der Reaktion wird zunächst durch erhöhte Temperatur (95 °C) eine Denaturierung der Ausgangs-DNA (sog. Template, in dieser Arbeit handelte es sich im cDNA) erreicht. Die so entstehende Einzelstrang-DNA dient als Matrize für die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge. Eine Herabsenkung der Temperatur (55–63 °C) bewirkt eine Hybridisierung der vorhandenen Oligonukleotidprimer an den komplementären Abschnitt der Template-DNA (sog. Annealing). Nun wird erneut erhitzt auf das Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq-Polymerase (72 °C), die mit den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) den neuen Strang synthetisiert (sog. Elongation).

2.15.1 Materialien

- Thermocycler

25-µl-Reaktionsansatz:

- 23 µl PCR-Master-Mix-Lösung (12,5 µl PCR Master Mix und 10,5 µl nukleasefreies Wasser)
- 1 µl Primer-Lösung (Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
- 1 µl der zu amplifizierenden cDNA (siehe Unterabschnitt 2.15)

Gemäß Herstelleranweisung wurde zu den Primer-Lösungen eine definierte Menge an nukleasefreiem Wasser gegeben, um das lyophilisierte Pellet zu lösen und eine standardisierte Konzentration von 100 pM in allen Primer-Stammlösungen zu erreichen. Aus diesen

Stammlösungen wurde die Primer-PCR-Lösung aus 5 µl Vorwärtsprimer-Lösung, 5 µl Rückwärtsprimer Lösung und 90 µl nukleasefreiem Wasser hergestellt.

2.15.2 Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion

Zunächst wurden 12,5 µl des PCR Master Mix in 10,5 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Zu dieser PCR-Master-Mix-Lösung wurden 1 µl der zu amplifizierenden DNA und 1 µl der Primer-Lösung hinzugefügt. Die Reaktion mit den sich wiederholenden Temperaturzyklen fand in einem Thermocycler statt. Es wurde je nach Produktmenge ein Programm mit 25, 29 oder 32 Zyklen verwendet.

2.16 Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion (Agarose-Gelelektrophorese)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und am häufigsten angewendete Methode, um DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge ihrer Größe nach aufzutrennen. Die DNA hat durch ihre vielen Phosphatgruppen eine überwiegend negative Ladung und wandert nach Anschluss an eine elektrische Quelle (50–150 V) durch die Gelmatrix zum positiven Pol. Die DNA-Stränge teilen sich ihrer Länge nach auf.

2.16.1 Materialien

- Spannungsquelle
- E-Gel 2 % mit SYBR Safe
- BlueJuice Gel Loading Buffer
- Nukleasefreies Wasser
- cDNA
- Molecular Imager Gel Doc XR System und Programm „Quantity One“ für qualitative DNA-Auswertungen
- DNA-Marker (DNA-Marker pBR 328 Mix I) und DNA-Leiter
- PCR-Produkt

2.16.2 Protokoll der Agarose-Gelelektrophorese und Auswertung

Zur Auswertung wurden 2%ige Agarosegele (E-Gel 2% mit SYBR von Invitrogen) mit je zwölf separaten Kammern zum Auftragen der DNA-Proben verwendet. 10 µl des PCR-Produktes wurden mit Pufferlösung, bestehend aus 1 µl Blue-Juice Gel Loading Buffer und

10 µl nukleasefreiem Wasser, vermennt und auf das Agarosegel aufgetragen. Der Elektrophoresepuffer und der SYBR-Green-Farbstoff waren bereits im Gel enthalten. Die DNA-Banden wurden auf einem Durchlichtschirm mit UV-Licht (Molecular Imager Gel Doc XR System) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation und Auswertung wurden Aufnahmen mit dem Programm „Quantity One“ erstellt.

2.17 PCR-Klonierung

Zur näheren Untersuchung der Funktion und Regulation eines Gens, in dieser Arbeit von CRIP1 und LDOC1, wurden Zellklone hergestellt, die das Zielgen überexprimieren. Im Laufe der Arbeit wurden unterschiedliche Zelllinien für die Herstellung dieser Klone verwendet. Im Falle von CRIP1 wurden zur transienten Transfektion HeLa-Zellen verwendet, für stabile Klone im Anschluss die Zelllinie MCF7. Für LDOC1 wurden ebenfalls HeLa-Zellen verwendet.

Bei der PCR-Klonierung werden grob folgende Schritte durchlaufen: Die DNA-Sequenz wird zunächst mittels PCR amplifiziert und in einen Vektor kloniert. Anschließend erfolgt die Transformation in kompetente Bakterien (z. B. *E. coli*), in denen der neu entstandene Vektor amplifiziert wird. Durch gleichzeitiges Vorhandensein eines Resistenzgens im Vektor wachsen nun nur diejenigen Bakterien auf antibiotikahaltigen Agarplatten, die über den entsprechenden Vektor verfügen. Die Bakterienkolonie wird gepickt und in ein separates Wachstumsmedium überführt, in dem sich die Bakterien monoklonal vermehren. Somit ist es möglich, eine genügend große Anzahl an Vektoren zu erhalten, um diese nach anschließender Isolierung und Reinigung in Säugetierzellen zu transferieren. Hier kommt es nun zu einer vorübergehenden Überexpression der entsprechenden Gensequenz. Im Gegensatz zur klassischen Klonierung werden bei der PCR-Klonierung weder Restriktionsenzyme noch eine Ligase benötigt. Dies wird durch die Verwendung eines spezifischen Vektors erreicht.

2.17.1 Herstellung des pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektors

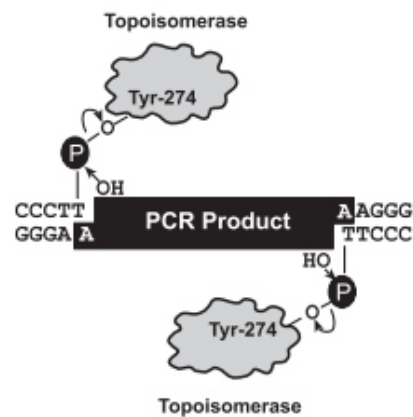


Abb. 7: Schematische Darstellung der Aufnahme des PCR-Produktes in den Vektor.
Copyright ©Life Technologies Corporation 2009, mit freundlicher Genehmigung.

Zur PCR-Klonierung wurde das pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit verwendet. Das zuvor amplifizierte PCR-Produkt hat aufgrund der Transferaseaktivität der Taq-Polymerase ein zusätzliches Adeninnukleotid am 3'-Ende. Der pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektor besitzt einen 3'-Thyminnukleotid-Überhang (sog. Sticky End, TA-Klonierung) (Marchuk et al. 1991). So kann das PCR-Produkt in den Vektor eingefügt werden, ohne dass eine vorherige Restriktion der DNA stattgefunden haben muss. Weiterhin ist die namensgebende kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase vorhanden, die eine Entspiralisierung der DNA bewirkt und somit die Insertion des PCR-Produktes ermöglicht.

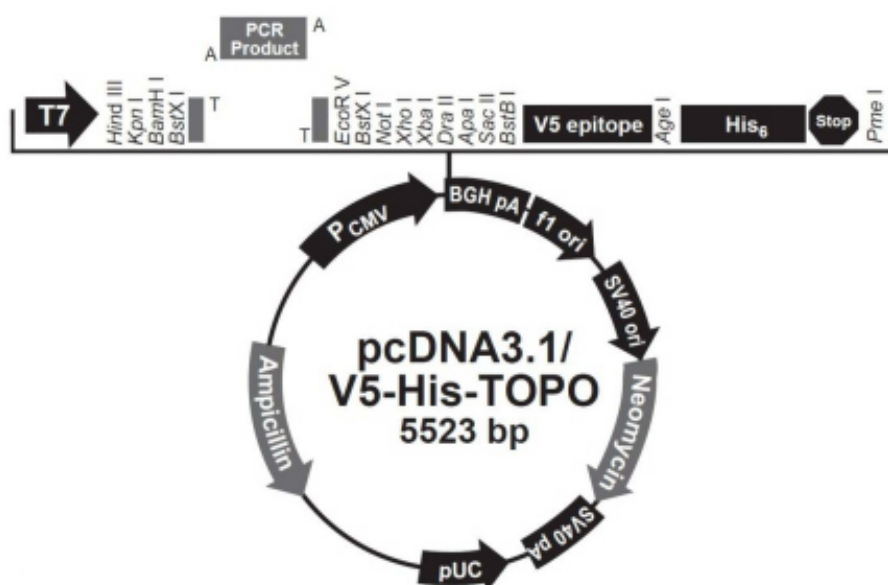


Abb. 8: Darstellung der wichtigsten Gene des pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektors.
Copyright ©Life Technologies Corporation 2009, mit freundlicher Genehmigung.

Der pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektor enthält u. a. das Gen für die Resistenz gegen Ampicillin (Basen 4527–5387), das V5-Epitop (Basen 1020–1061), einen Promotor (T7, Basen 863–882) sowie das BGH(*bovine growth hormone*)-Polyadenylierungssignal (Basen 1110–1324). Die TOPO-Klonierungsstelle befindet sich zwischen den Basen 953 und 954.

2.17.2 Materialien

- Kompetente *E.-coli*-Bakterien
- MicroPulser Electroporator

Für die TOPO-Klonierungsreaktion wurden folgende Materialien verwendet:

- 1 µl PCR-Produkt-Lösung (23 µl PCR-Master-Mix-Lösung, siehe Unterabschnitt 2.15.1), 1 µl Lösung des CRIP1- oder LDOC1-Full-Length-Primers (siehe Abschnitt 2.6) und 1 µl cDNA der Zelllinie T7; für die PCR der PCR-Produkt-Lösung wurden 32 Zyklen durchgeführt)
- 2 µl nukleasefreies Wasser
- 1 µl Salzlösung aus dem pcDNA 3.1/V5-His-TOPO TA Expression Kit
- 1 µl pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektor

2.17.3 TOPO-Klonierungsprotokoll – Transformation der DNA in kompetente *E.-coli*-Bakterien

Für den Transformationsansatz wurden das PCR-Produkt, die Salzlösung, der TOPO-Vektor und nukleasefreies Wasser gemäß den Herstellangaben vermengt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

2.17.4 Transformation mittels Elektroporation

Die Methode der Wahl für die Herstellung kompetenter Bakterien war in dieser Arbeit die Elektroporation (Neumann et al. 1982). Hierbei wird die Bakterienmembran mithilfe eines elektrischen Impulses (ca. 2000 mV) vorübergehend durchlässig gemacht, was die Aufnahme der DNA ins Bakterium ermöglicht. Mit der Elektroporation lassen sich Kompetenzen von bis zu 10^7 – 10^{10} pro µg DNA erreichen, auch bei schlechteren Bakterienpräparationen.

Es wurden 2 µl des Reaktionsansatzes und 50 µl Bakteriensuspension in eine Elektroporationskuvette gegeben. Direkt nach dem Impuls wurden 250 µl SOC(Super Optimal Broth mit 20 mM Glucose)-Medium zu den geschockten Bakterien hinzugefügt. Nach anschließender

Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C konnten die Bakterien auf selektivem LB-Agar ausplattiert werden.

2.18 Das Herstellen von flüssigem Wachstumsmedium und LB-Agar

LB(lysogeny broth)-Medium ist das am häufigsten verwendete Nährmedium für *E. coli*. Damit sich nur die Bakterien mit dem enthaltenen Resistenzplasmid vermehren konnten, wurde ein selektives Nährmedium bzw. ein selektiver Nährboden mit enthaltenem Ampicillin hergestellt.

2.18.1 Materialien

Herstellung von 1 Liter LB-Medium (Ampicillinkonzentration: 50 µg/ml) und LB-Agar:

- 500 ml destilliertes Wasser
- 5 g Trocken-LB-Medium
- 12,5 mg Ampicillin
- 2,5 g Agar-Puder
- Präzisionswaage Mattler PM460

2.18.2 Protokoll zur Herstellung des Ampicillin-versetzten LB-Agar

Es wurde jeweils die Hälfte des angesetzten LB-Mediums für das flüssige Wachstumsmedium und für den LB-Agar verwendet.

Flüssiges Wachstumsmedium: In einem sterilen Glaskolben wurden 5 g Trockenmedium mit 250 ml destilliertem Wasser vermengt und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen des LB-Mediums wurden 12,5 mg Ampicillin hinzugegeben.

LB-Agar: In einem sterilen Glaskolben wurden 250 ml destilliertes Wasser mit 5 g Trockenmedium und 2,5 g Agar vermengt (1 % Agar). Im Anschluss wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach kurzem Abkühlen wurden 12,5 mg Ampicillin hinzugefügt und der LB-Agar auf Petrischalen verteilt. Sobald der LB-Agar vollständig erkaltet war, konnte er als Nährmedium für Bakterien fungieren.

2.19 Ausplattieren und Selektionieren der Bakterien

Die fertigen Transformationsansätze wurden auf den LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es wuchsen nur diejenigen Zellen, die ein Resistenzplasmid aufgenommen hatten. Unklar blieb jedoch, ob die Kolonien auch das PCR-Produkt aufgenommen hatten oder ob der PCR-Abschnitt korrekt inseriert war. Es wurden daher per Zufallsprinzip acht Kolonien gepickt und diese jeweils in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zusammen mit flüssigem Wachstumsmedium für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mittels PCR konnten sie im Anschluss auf Vorliegen des (korrekten) Inserts kontrolliert werden (siehe Unterabschnitt 3.5.1).

2.20 Plasmidpräparation

Nach Abschluss der Vorselektion der Kolonien wurde die Plasmid-Präparation durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien zunächst lysiert, um die anschließende Bindung der DNA an die spezifische Membran einer Reinigungskartusche zu ermöglichen.

2.20.1 Materialien

Es wurde das NucleoSpin Plasmid Kit mit folgenden Bestandteilen verwendet:

- Resuspensionspuffer A1 (15 ml, wurde erst nach Zugabe von 6 mg der RNase A eingesetzt)
- Lysepuffer A2 (15 ml)
- Neutralisierender Puffer A3 (20 ml)
- Waschpuffer A4 (2 × 6 ml Konzentrat, jeweils Zugabe von 24 ml $\geq 99,5\%$ igem Ethanol notwendig)
- Elutionspuffer AE (15 ml 5 mM Tris/HCl, pH 8,5)
- 6 mg RNase A (lyophilisiert)
- NucleoSpin-Plasmid-Kappe (50 Stück)
- 2-ml-Sammelgefäße (50 Stück)

Zusätzlich verwendet wurde:

- $\geq 99,5\%$ Ethanol

2.20.2 Plasmidpräparationsprotokoll

Zur Plasmidpräparation wurden gemäß den Herstellerangaben folgende Schritte durchgeführt:

1. Pelletierung: Zuerst wurden 1–5 ml der Bakterienkultur transformierter *E.-coli*-Zellen in ein Reaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert (11 000 g, 30 sek.), um diese zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen.
2. Lyse: Im Anschluss wurde das Pellet mit 250 µl A1-Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Der Suspension wurden 250 µl A2-Puffer hinzugefügt. Es folgte ein vorsichtiges Schütteln und Umkehren des Reaktionsgefäßes und eine Inkubation der Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden der Suspension 300 µl A3-Puffer beigelegt und durch das oben beschriebene vorsichtige Schütteln (6–8-mal) vermischt. Durch erneute Zentrifugation (11 000 g, 5 min) wurde das Lysat klar.
3. Bindung der DNA: Eine NucleoSpin-Plasmid-Kappe wurde auf ein 2-ml-Sammelgefäß platziert und maximal 750 µl des Lysats abpipettiert und aufgetragen. Danach wurde für 1 Minute bei 11 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die NucleoSpin-Plasmid-Kappe wieder auf das Sammelgefäß platziert.
4. Waschen: Von dem zuvor in Ethanol gelösten A4-Puffer wurden 600 µl aufgetragen und für 1 Minute bei 11 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die NucleoSpin-Plasmid-Kappe wieder auf das Sammelgefäß platziert.
5. Trocknen: Durch wiederholte Zentrifugation (11 000 g, 2 Min.) wurde die selektive Membran getrocknet. Im Anschluss wurde das Sammelgefäß zusammen mit dem Überstand verworfen und die NucleoSpin-Plasmid-Kappe auf ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert.
6. Elution: 50 µl AE-Puffer wurden aufgetragen und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach zentrifugiert (11 000 g, 1 min). Der nun im Reaktionsgefäß gesammelte Durchfluss (50 µl) enthielt die Plasmide.

2.21 Transfektion

Der Begriff Transfektion beschreibt das Einbringen rekombinanter DNA in eukaryotische Zellen, um dort eine vorübergehende Überexpression der zu untersuchenden Proteine zu bewirken. In dieser Arbeit wurde mit der Lipofektion gearbeitet, wobei sich durch elektrostatische Wechselwirkungen der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA mit der hydrophilen, positiv geladenen Kopfgruppe der Lipide Lipoplexe bilden. Somit ist eine

endozytotische Aufnahme der DNA möglich. Vermutet werden auch direkte Transportmechanismen in den Zellkern. Im Zytoplasma wird die DNA aus dem Endosom freigegeben und gelangt mit der nächsten mitotischen Zellteilung letztendlich in den Zellkern.

2.21.1 Materialien

- 50 µl serumfreies Medium pro µl Plasmidlösung
- 1 µl Lipofektamin pro µl Plasmidlösung
- Plasmidlösungen
- HeLa- bzw. MCF7-Zelllinie

2.21.2 Transfektionsprotokoll

Es wurde 1 µl des Transfektionsreagenzes mit 50 µl serumfreiem Medium verdünnt und das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch 1 µl der Plasmid-DNA wurde mit 50 µl verdünnt. Die beiden Verdünnungen wurden im Anschluss vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transformationsansatz mit den entstandenen Lipoplexen konnte nun zu den jeweiligen Zellen hinzugegeben werden. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C, wobei nach ca. der Hälfte der Zeit das Medium gewechselt wurde, konnten die Zellen weiterbearbeitet werden.

Neben der Herstellung transienter Zellklone (HeLa), wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile CRIP1-überexprimierende Zellklone mit MCF7-Zellen generiert. Hierzu wird sich das in dem Plamid enthaltene Resistenzgen gegen das Antibiotikum Neomycin zu Nutze gemacht. Die transfizierten MCF7-Zellen wurden über drei Wochen in Geneticin-haltigem Medium (40 mg/ml) kultiviert. Geneticin, auch G418 genannt, ist ein Breitspektrumantibiotikum und Neomycin-Analogon.

2.22 Zellfixierung

Damit die Zellen bei der späteren Anfärbung und den mehrfachen Spülvorgängen auf dem Objektträger bleiben, bedient man sich der Zellfixierung. In dieser Arbeit wurde dazu Methanol verwendet. Die mit dem Methanol einhergehende Denaturierung bedingt eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran und ermöglicht das spätere Anfärben durch Antikörper.

2.22.1 Materialien

- Methanol $\geq 99,98\%$

2.22.2 Protokoll der Zellfixierung

Nach 24 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurden die transfizierten Zellen entnommen, der Transformationsansatz mit dem Wachstumsmedium abgegossen und der Objektträger mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 5 Minuten mit auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühltem Methanol inkubiert. Nach anschließender Entfernung des Methanols konnte der Objektträger direkt mit Immunfluoreszenz bearbeitet oder bis zum nächsten Gebrauch eingefroren werden.

2.23 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenz beruht auf der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes und ermöglicht die Detektion eines bestimmten Proteins in einem Gewebe oder einer Zelle.

Bei der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie bedient man sich eines Antikörpers, der an ein Fluorochrom gebunden ist. Bindet der Antikörper spezifisch an das Antigen, so ist es möglich, dieses durch das Fluorochrom mittels Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Im Gegensatz zur direkten werden bei der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie zwei Antikörper benötigt: ein primärer Epitop-spezifischer Antikörper, der an das gesuchte Protein bindet, und ein mit Fluorochrom gekoppelter sekundärer Antikörper, der wiederum spezifisch an den primären Antikörper bindet. Der sekundäre Antikörper kann letztlich durch seinen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen, kann dieser im Rahmen einer Negativprobe auch alleine zu den Proben gegeben werden.

2.23.1 Materialien

- Erstantikörper (Maus-anti-V5-Tag monoklonaler Antikörper)
- Zweitantikörper, Indocarbocyanin-gekoppelt (Cy3-konjugiertes-Ziegen-Anti-Maus IgG)
- Einbettmedium und PBS
- Mikroskop Axiophot und Programm AxioVision
- Anregungsfilter/Excitation-Filter (Wellenlänge 460 nm)

2.23.2 Protokoll zur Präparation der Zellen und Mikroskopie

Zu Beginn wurden die in der Kultur gezüchteten Zellen auf einen Objektträger mit mehreren Kulturkammern übertragen. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert (siehe Unterabschnitt 2.23) und für 90 Minuten mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit

PBS wurde der Zweitantikörper zu den Zellen hinzugegeben und mit diesem für 45 Minuten inkubiert. Um eine gute Beurteilung unter dem Mikroskop zu ermöglichen, wurde der Objektträger erneut mit PBS gewaschen und anschließend zur Vermeidung von Salzkristallen mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Fixierung der Zellen wurde nach dem Abnehmen des Kammersystems ein Einbettmedium verwendet.

Unter dem Mikroskop (20x-Objektiv) leuchteten die CRIP1-überexprimierenden Zellen mit Immunfluoreszenz (Filter für die Wellenlänge 460 nm, grünes Licht) rot auf. Die Aufnahmen und die Belichtungszeiten wurden mithilfe des Programms AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH) eingestellt.

2.24 Humaner Zytokin-Antikörper-Array

Miniarrays und Microarrays eignen sich zur Expressionsanalyse von Genen, deren Funktion bislang nicht geklärt ist. Zytokine wiederum sind Proteine, die das Wachstum und die Differenzierung der Zelle beeinflussen. Ihre Hoch- und Runterregulierung wird beeinflusst durch biochemische Prozesse innerhalb der Zelle und unterscheidet sich z. B. in Krebszellen oder entzündeten Geweben von dem Zytokinprofil einer physiologischen Zelle. Um Hinweise auf die Funktion von CRIP1 zu erlangen wurde mithilfe der zuvor hergestellten CRIP1-überexprimierenden Zellen (MCF7 bzw. HeLa) ein Antikörperarray durchgeführt (Zytokin Array, RayBio C-Series Human Cytokine Antibody Array 6 Kit, Ray Biotech). Die Probe (Zelllysate) wird dazu auf die auf dem Array fixierten Antikörper aufgetragen. Es entsteht eine Antigen-Antikörper-Bindung, die im Anschluss durch einen weiteren Antikörper detektiert und dann mit einem markierten Zweitantikörper darstellbar gemacht wird.

2.24.1 Materialien

- Antikörper-Array
- Blockpuffer
- Biotin-konjugierter Antikörper (in 2 ml Blockpuffer lysiert)
- HRP(*horseradish peroxidase*)-Streptavidin-Konzentrat (1000-fach verdünnt mit Blockpuffer)
- Waschpuffer I und II (je 20-fach verdünnt mit destilliertem Wasser)
- Detektionspuffer C und D
- Inkubationstablett

2.24.2 Protokoll des Zytokinarrays

Zur Herstellung der Zelllysate wurde das Medium abpipettiert und 500 µl RIPA-Puffer hinzugegeben. Der so vollständig bedeckte Zellrasen wurde im Anschluss zur Lyse der Zellen für 15 Minuten eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Zellrasen mehrfach auf- und abpipettiert und die somit vom Boden der Kulturschale gelösten Zellen in ein Probengefäß überführt. Das Lysat konnte im Anschluss für 2 Minuten mit der Tischzentrifuge zentrifugiert werden. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde abpipettiert und in ein separates Probengefäß überführt. Zur Durchführung des Zytokinarrays wurden gemäß den Herstellerangaben folgende Schritte durchgeführt (alle Schritte während der Inkubation erfolgten unter kontinuierlichem Schwenken auf dem Schüttler):

1. Blocking: Die Array-Membran wurde zunächst auf dem Inkubationstablett arrangiert und mit 2 ml Blockpuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Puffer mit einer Pipette entfernt.
2. Inkubation: Der Ansatz mit dem zu untersuchenden Protein wurde im Verhältnis 1 : 1 mit dem Blockpuffer verdünnt und 1 ml der Lösung auf den Array aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat erneut mittels einer Pipette entfernt.
3. Waschen mit Waschpuffer I: Der Waschpuffer I wurde wie oben angegeben verdünnt. Waschen der Membran mit 2 ml des Waschpuffer I für insgesamt dreimal. Es wurde jeweils 5 Minuten inkubiert und die Waschlösung vor dem erneuten Auftragen vollständig entfernt.
4. Waschen mit Waschpuffer II: Es wurden 2 ml des Waschpuffers II hinzugefügt und für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde erneut abpipettiert und der Vorgang weitere zwei Male wiederholt.
5. Inkubation mit dem Biotin-konjugierten Antikörper: Der Biotin-konjugierte Antikörper wurde wie oben angegeben mit dem Blockpuffer verdünnt und 1 ml der Lösung auf die Membran gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1–2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Aspiration der Lösung wurden die Waschschrirte 3 und 4 wiederholt.
6. HRP-Streptavidin-Inkubation: 2 ml der 1000-fach verdünnten Streptavidin-Lösung wurden zu der Membran hinzugegeben und die Membran für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abpipettiert und die Membran gemäß den Schritten 3 und 4 erneut gewaschen.
7. Detektion: Aufgrund der Biotin-Streptavidin-Interaktion ist eine Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels Chemolumineszenz möglich. Die Membran

wird hierzu auf Chromatografiepapier gelegt. Verbliebener Waschpuffer wurde mit Papiertüchern entfernt, woraufhin die Membranen auf eine vom Hersteller zur Verfügung gestellte Plastikunterlage übertragen werden konnten. Im nächsten Schritt wurden die Detektionspuffer C und D in gleichen Mengen (je 250 µl, insgesamt 500 µl pro Membran) gemischt und für 2 Minuten auf die Membran gegeben. Die Detektionspuffer wurden abgegossen, die Membran durch eine weitere Plastikunterlage fixiert und die Chemolumineszenzsignale in der abgedunkelten Kammer des Geldokumentationsgeräts mittels der eingebauten LCD Kamera aufgezeichnet (Molecular Imager Gel Doc XR System, BioRad Laboratories GmbH). Zur Dokumentation und Auswertung wurden Aufnahmen mit dem Programm „Quantity One“ erstellt.

2.25 Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie dient der Zellanalyse und Zellquantifizierung auf Einzelzellebene. Hierzu wird eine heterogene Zellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung durch einen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge geleitet, wobei Lichtbeugung und -streuung der Zellen Rückschluss auf bestimmte Eigenschaften zulassen. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht ($FSC = forward\ scatter$) in Richtung des Laserstrahls ist proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht ($SSC = side\ scatter$) wird in einem Winkel von 90 ° relativ zum Laserstrahl gemessen und steht im Zusammenhang mit der Granularität des Zytoplasmas und der Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (*Fluorescence-activated Cell Sorting* – FACS) ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie, die mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern arbeitet. Ähnlich wie beim beschriebenen Immunfluoreszenzverfahren wurden die Zellen mit dem Erstantikörper (Anti-CRIP1- bzw. Anti-Her2/neu-Antikörper) inkubiert und anschließend mit einem FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus bzw. -anti-Hase) zur Detektion des Erstantikörpers inkubiert. Dazu wurden die Zellen allerdings nicht auf Glasplättchen inkubiert, sondern für die FACS-Analyse als Suspensionszellen mit den Antikörpern inkubiert. Die anschließenden Messungen am FACS-Gerät wurden freundlicherweise von der Technischen Assistentin Martina Rahmeh durchgeführt, da zur Bedienung des Geräts technische Erfahrung nötig ist.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Darstellung von Her2/neu und CRIP1 in MDA-MB-453 Zellen

Der initiale Anstoß dieser Arbeit war die mögliche Korrelation zwischen der CRIP1- und der Her2/neu-Expression. Im Rahmen einer MALDI-Analyse unterschiedlicher Brustkrebsgewebeproben zeigte sich in Her2/neu-überexprimierenden Tumoren ebenfalls eine erhöhte Expression von CRIP1 (Rauser et al. 2010). Ziel war es daher, diese Korrelation auf zellbiologischer Ebene nachzuweisen und gegebenenfalls im Anschluss einen molekularbiologischen Zusammenhang der beiden Proteine zu untersuchen.

Hierzu wurden CRIP1 und Her2/neu mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie in der Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 untersucht. Der CRIP1-Antikörper, ein polyklonaler Kaninchenantikörper, wurde uns freundlicherweise von Professor Axel Walch des Helmholtzzentrums der Technischen Universität München (Neuherberg) zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsgruppe von Professor Walch war es auch, die erstmals eine mögliche Beziehung zwischen der Her2/neu- und der CRIP1-Expression identifizierte (Ludyga et al. 2013).

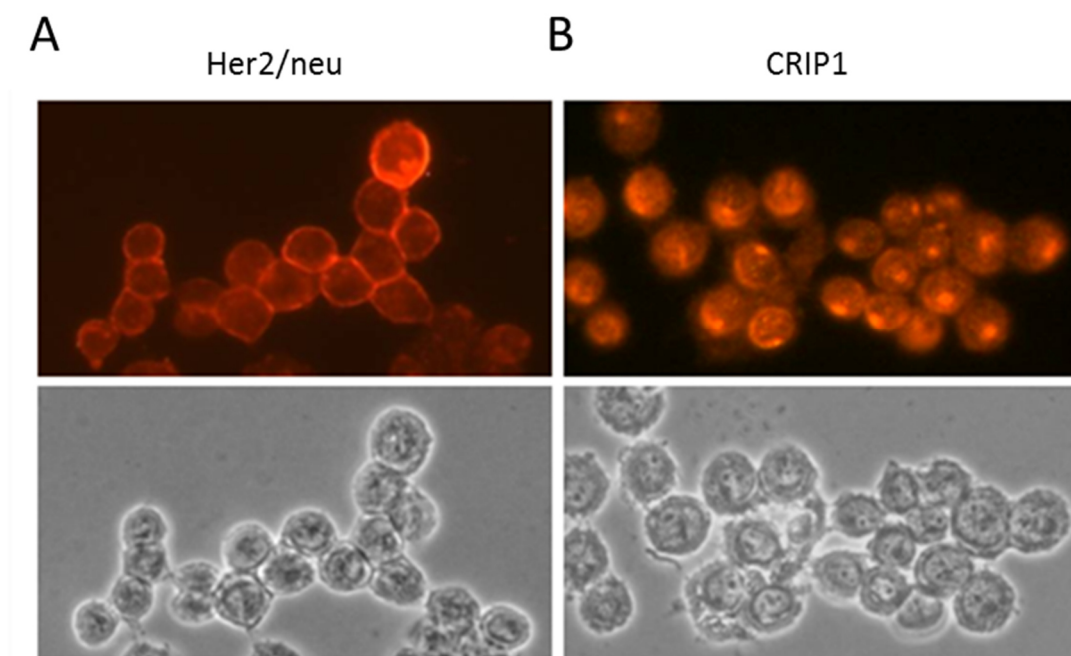


Abb. 9: Her2/neu- und CRIP1-Expression in MDA-MB-453-Zellen.

(A) Darstellung von Her2/neu. (B) Die Her2/neu-überexprimierende Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 zeigt in der Immunfluoreszenz eine Anreicherung von CRIP1. Die jeweiligen Erstantikörper wurden dazu mit einem Cy3-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchenantikörper sichtbar gemacht.

In den Zellen zeigte sich wie erwartet eine immunhistochemische Anreicherung von Her2/neu an den Zellmembranen. Ebenfalls ließ sich in diesen Zellen eine verstärkte, vorwiegend intrazelluläre Anreicherung von CRIP1 nachweisen. Dies bestärkte die Annahme einer gleichzeitig hohen Expression der beiden Proteine auf zellbiologischer Ebene. Bei CRIP1 fiel zudem noch eine charakteristische perinukleäre Anreicherung in der Immunfluoreszenz auf, die typisch für entweder residente oder transiente Proteine des Golgi-Apparates ist. Darum wurden an dieser Stelle weitere Untersuchungen zu dieser auffälligen Lokalisation von CRIP1 unternommen.

3.2 Die Lokalisation von CRIP1 in der Zelle – eine Immunfluoreszenzanalyse

3.2.1 CRIP1 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453

In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453 zeigte sich eine zellkernnahe Anreicherung von CRIP1. Verwendet wurden neben dem CRIP1-Antikörper der blau fluoreszierende DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) sowie der monoklonale Histon-H1-Primärantikörper und ein mit Alexa Fluor 488 gekoppelter Sekundärantikörper (grün).

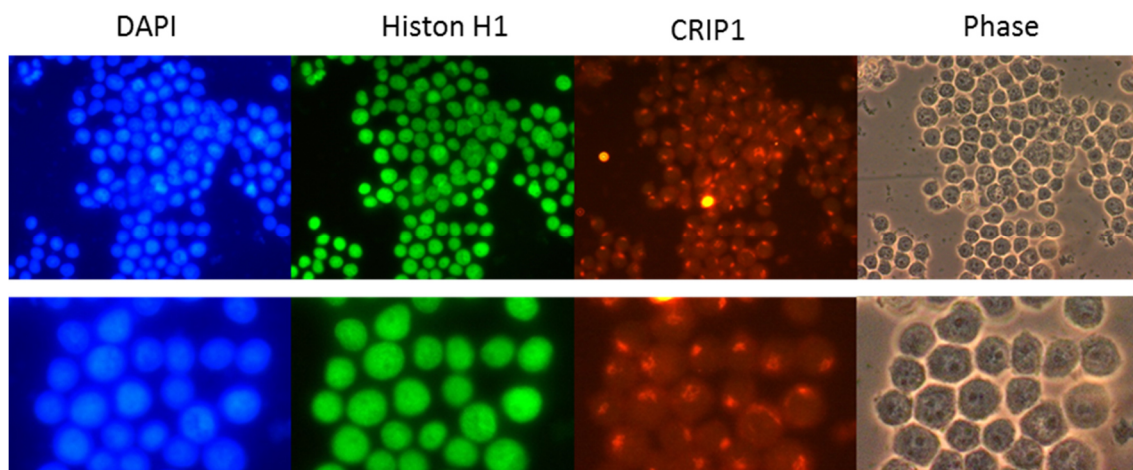


Abb. 10: Immunfluoreszenz mit perinukleärer Lokalisation von CRIP1 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453.

Unten: Vergrößerung. Der CRIP1-Antikörper wurde erneut mit dem Cy3-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchenantikörper sichtbar gemacht.

3.2.2 CRIP1 in der Kolonkarzinomzelllinie TC7

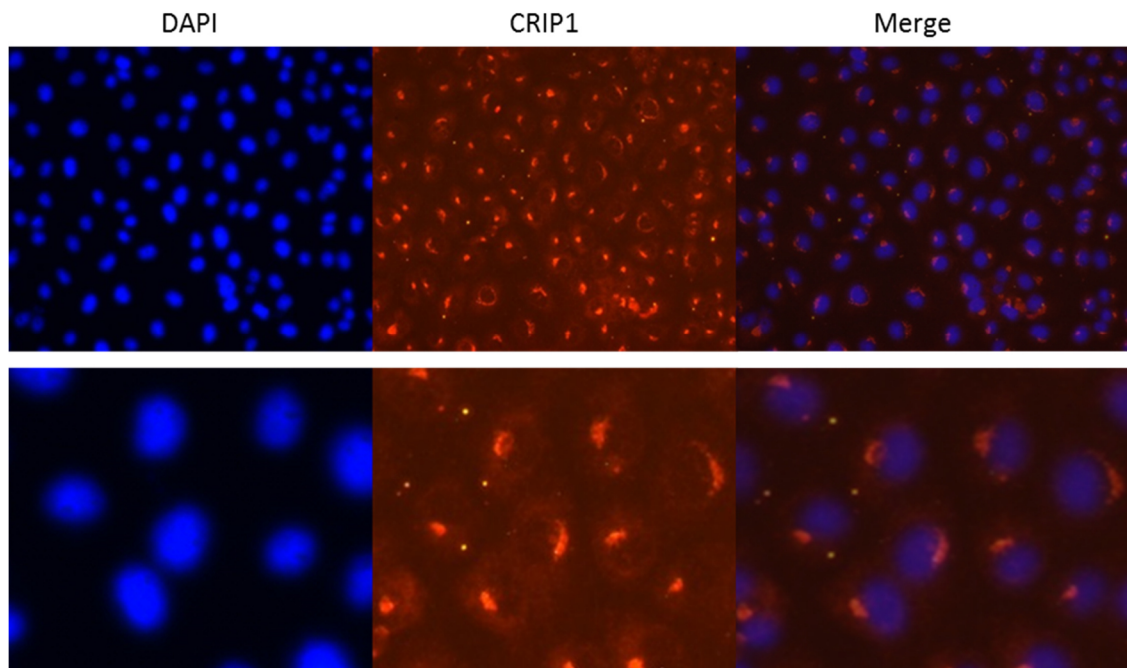


Abb. 11: Immunfluoreszenzanalyse mit zellkernnaher Lokalisation von CRIP1 in der Kolonkarzinomzelllinie TC7.
Unten: Vergrößerung.

Da CRIP1 als ein stark im Darmepithel exprimiertes Protein beschrieben wurde (Birkenmeier und Gordon 1986), untersuchten wir zusätzlich die Lokalisation von CRIP1 in der TC7-Darmepithelzelllinie. Diese Zelllinie eignete sich außerdem besonders gut für die Immunfluoreszenz, da die einzelnen Zellen groß und sehr flach ausgebreitet sind und eine CRIP1-Expression in Kolonkarzinomzellen bereits vorbeschrieben war (Groene et al. 2006).

3.3 Quantifizierung und Regulation der CRIP1 Expression

3.3.1 FACS-Analyse der Her2/neu und CRIP1 Expression in Brustkrebszelllinien

In den Untersuchungen der FACS-Analyse (Abb. 12) konnte in den Brustkrebszelllinien T47D, MCF7, MDA-MB-453, -231 und -435 keine Assoziation zwischen der Expression von Her2/neu und CRIP1 nachgewiesen werden. Auch in den nicht tumorösen Zelllinien MCF10A und HBL-100 ist keine Korrelation der Expression der beiden Gene festzustellen. Dennoch fiel auf, dass hoch entdifferenzierte Brustkrebszelllinien wie MDA-MB-231 und

MDA-MB-435 eine höhere Expression von CRIP1 aufwiesen als Zelllinien mit einem geringeren Potenzial für Metastasierung (T47D, MCF7). Diese Annahme wird zusätzlich unterstützt durch den Nachweis eines ebenfalls niedrigeren Levels der Expression von CRIP1 in der nicht tumorösen Epithelzelllinie der Brustdrüse MCF10A. Die nicht tumoröse HBL-100-Myoepithelzelllinie wies dagegen ein recht hohes Expressionsniveau von CRIP1 auf. Diese Zelllinie wurde u. a. deswegen verwendet, da vermutet wird, dass sog. Triple-negative Mammakarzinomzellen (wie MDA-MB-231, MDA-MB-435) aus diesem Zelltyp entstehen, während die sog. „basal-type“-Mammakarzinomzellen (wie T47D, MCF7) aus MCF10A-ähnlichen Zellen entstehen.

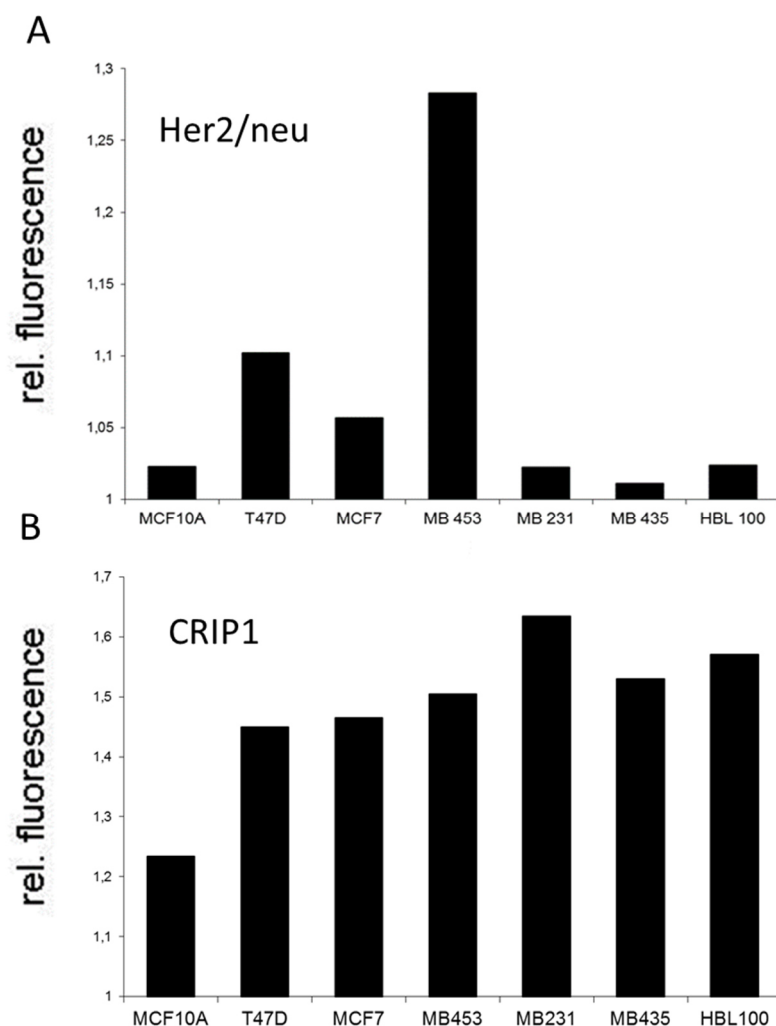


Abb. 12: Expression von Her2/neu und CRIP1 in Brustkrebszelllinien, FACS-Analyse.

Die Mammakarzinomzelllinien sowie die nicht tumorösen Zelllinien MCF10A und HBL-100 wurden durch FACS-Analyse auf die Expression von CRIP1 und Her2/neu hin untersucht. Die Untersuchungen wurden an fixierten und permeabilisierten Zellen vorgenommen, um auch die intrazelluläre CRIP1-Expression nachzuweisen.

3.3.2 FACS-Analyse der CRIP1 Expression mit Heregulin, Epidermal Growth Factor, Lapatinib und Sorafenib

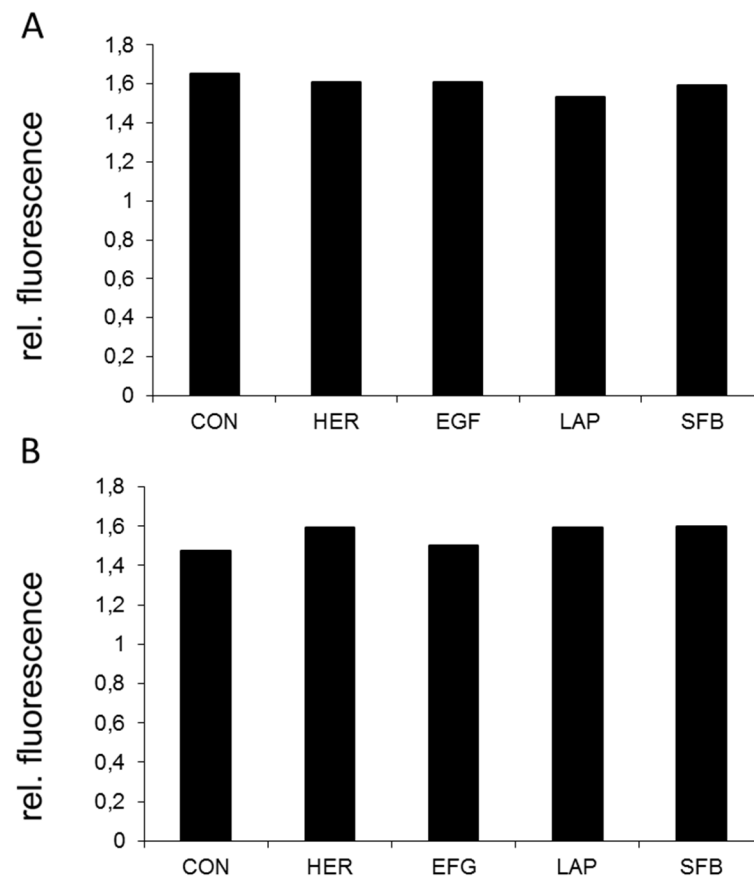


Abb. 13: Relative Fluoreszenzanreicherung in der Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 (A) und in der Brustkrebszelllinie T47D (B) unter medikamentöser Her2/neu-Inhibierung sowie unter Stimulation mit Heregulin und EGF, FACS-Analyse. Con=Kontrolle. Weder Heregulin (HER) noch Lapatinib (LAP) beeinflussten die CRIP1-Expression merklich. Untersucht wurden die Her2/neu-überexprimierende Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 sowie die Tumorzelllinie T47D des duktales Mammakarzinoms. Als modulatorische Substanzen wurden Heregulin (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml), Lapatinib (10 µg/ml) und Sorafenib (10 µg/ml) verwendet.

Heregulin und der EGF gehören zu der Familie der Wachstumsfaktoren und wurden bereits in Unterunterabschnitt 1.3.4 genauer beschrieben. Heregulin ist als Ligand der humanen EGF-Rezeptoren Gegenstand aktueller Forschungen bezüglich seines Nutzens z. B. als Biomarker im Rahmen einer Krebstherapie (Kawakami und Yonesaka 2016). Der EGF ist Ligand der ErbB-Rezeptor-Familie. Eine Überaktivierung dieser Rezeptoren wird mit einer schlechten Prognose und der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht, z. B. bei Triple-negativen Brustkrebsarten und beim inflammatorischen Brustkrebs (Masuda et al.

2012). Die ausgelöste Signalkaskade wird seit mehreren Jahrzehnten untersucht. Die Hoffnung ist, durch eine Inaktivierung bzw. eine Inhibierung der Rezeptoren gezielt in die Tumorgenese und -progression einzugreifen. Lapatinib (Tykerb, Tyverb, GlaxoSmithKline) ist ein dualer Tyrosinkinaseinhibitor, der die intrazelluläre Tyrosinkinase-Einheit des Her2/neu-Rezeptors blockiert und in der Therapie von Her2/neu-positiven Mammakarzinomen verwendet wird. Er bewirkt eine erhöhte Apoptoserate in Tumorzellen. Sorafenib (Nexavar, Bayer AG) ist ein Proteinkinaseinhibitor und reduziert die Zellteilung und Angiogenese von Tumorzellen. Anders als Lapatinib ist Sorafenib nicht für die Therapie von Brustkrebs zugelassen und wird als Zweit- und Drittlinientherapeutikum bei z. B. Nierenzellkarzinomen verwendet. Letztlich konnte auch hier kein signifikanter Einfluss der genannten Substanzen auf die CRIP1-Expression in dieser Tumorzelllinie festgestellt werden (siehe Abb. 13).

3.3.3 RT-PCR mit Lapatinib und Sorafenib

In der Annahme, dass CRIP1 über Her2/neu bzw. andere Tyrosinkinasen reguliert werden kann, untersuchten wir die CRIP1-mRNA-Expression in Gegenwart von spezifischen und unspezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren mittels RT-PCR. In der Versuchsreihe wurde die Her2/neu-überexprimierende Brustkrebszelllinie MB-MDA-453 und die Brustkrebszelllinie MCF7 mit 10 µl/ml der jeweiligen Substanz über Nacht inkubiert. Hier ließen sich die oben dargestellten Beobachtungen bestätigen. Sowohl Lapatinib als auch Sorafenib schienen keinen hemmenden Einfluss auf die CRIP1-Expression zu haben.

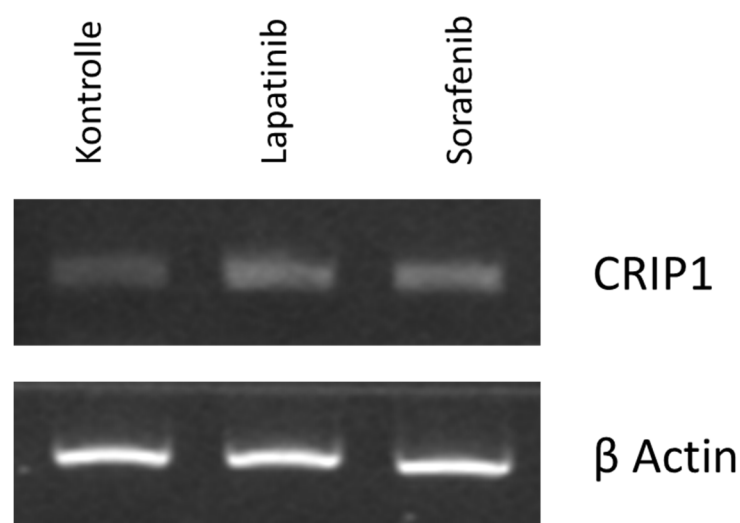


Abb. 14: CRIP1-Expression in der Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 mit Lapatinib (10 µg/ml) und Sorafenib (10 µg/ml) nach 12 Stunden Inkubation.

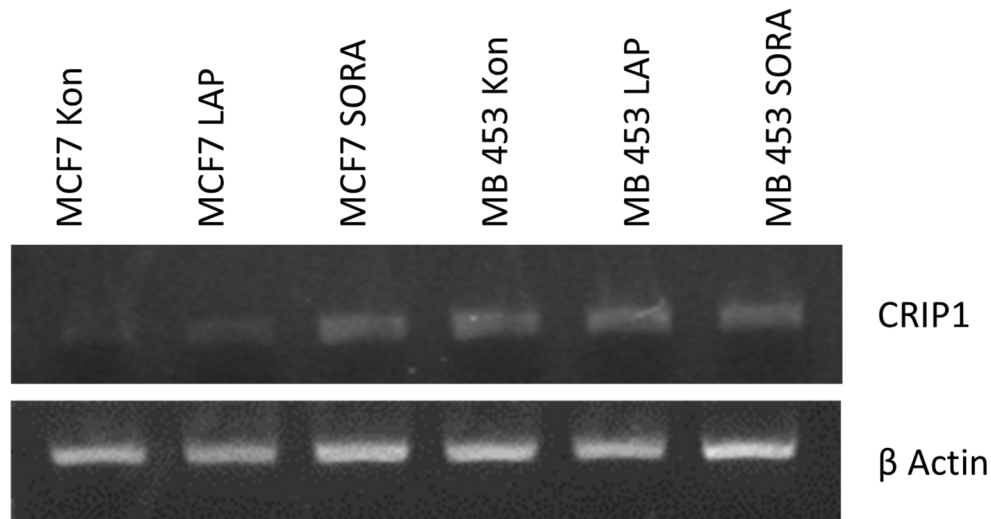


Abb. 15: CRIP1-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-453 und MCF7 versetzt mit Lapatinib und Sorafenib ($10 \mu\text{g/ml}$) nach 12 Stunden Inkubation. Kon = Kontrolle.

3.3.4 Dexamethason

CRIP1 wurde funktional mit einer Immunmodulation in Verbindung gebracht (Lanningham-Foster et al. 2002; Cousins und Lanningham-Foster 2000). Weiterhin wurde eine Modulation der CRIP1-Expression durch Glukokortikoide in Dünndarmepithelzellen der Maus beschrieben (Levenson et al. 1993). Dexamethason ist ein Glukokortikoid und wirkt immun-supprimierend und antiinflammatorisch. Wir führten eine RT-PCR-Analyse mit Dexamethason und unterschiedlichen Brustkrebszelllinien (MDA-MB-453, MCF7, T47D) durch. Die Inkubation erfolgte über 12 Stunden. Wie in Abb. 16 dargestellt, scheint Dexamethason keinen Effekt auf die CRIP1-mRNA-Expression in diesen Tumorzelllinien zu haben. In der Mammakarzinomzelllinie HBL-100 scheint die CRIP1-mRNA-Expression durch das Hinzufügen von Dexamethason dagegen hochreguliert zu werden (Abb. 17). In vielen Tumorzellen wird ein Verlust der Glukokortikoidrezeptoraktivität beschrieben (Vilasco et al. 2013). Gleichzeitig wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors und einer verhinderten Apoptose in Brustkrebszellen beschrieben (Aziz et al. 2012; Wu et al. 2005). Die genauen Mechanismen hierzu sind bislang unklar. Unsere Beobachtung legt nahe, dass die Zelllinie HBL-100 weiterhin über einen funktionierenden Glukokortikoidrezeptor verfügt. Dies würde vorhergehende Studien stützen, die eine vermehrte Expression von CRIP1 z. B. in intestinalen Zellen nach Inkubation mit Dexamethason beschrieben (Levenson et al. 1993), und ebenso unsere Vermutung, dass CRIP1 eine Rolle in der Tumprogression spielt.

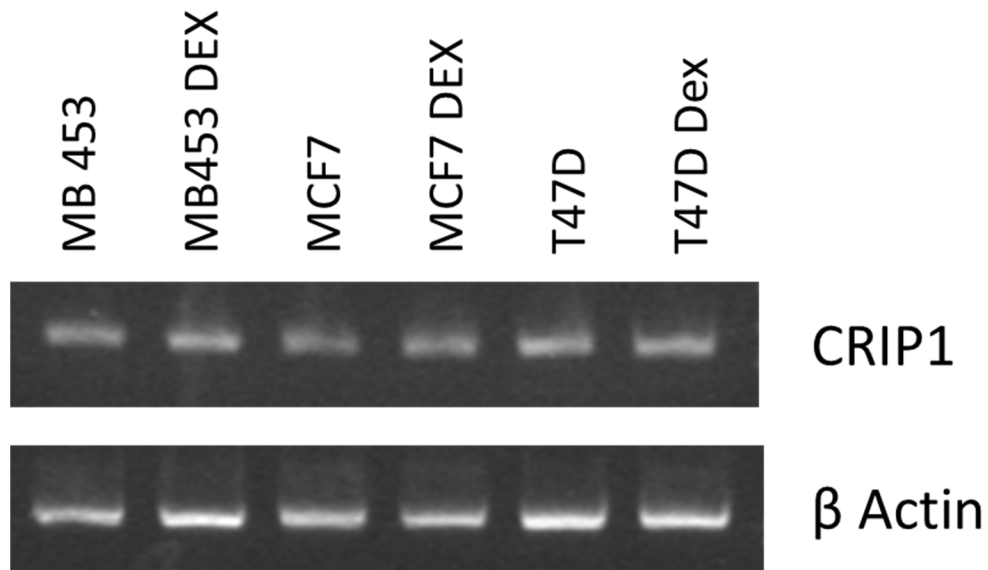


Abb. 16: CRIP1-Expression in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-453, MCF7 und T47D mit und ohne Dexamethason (100 nM).

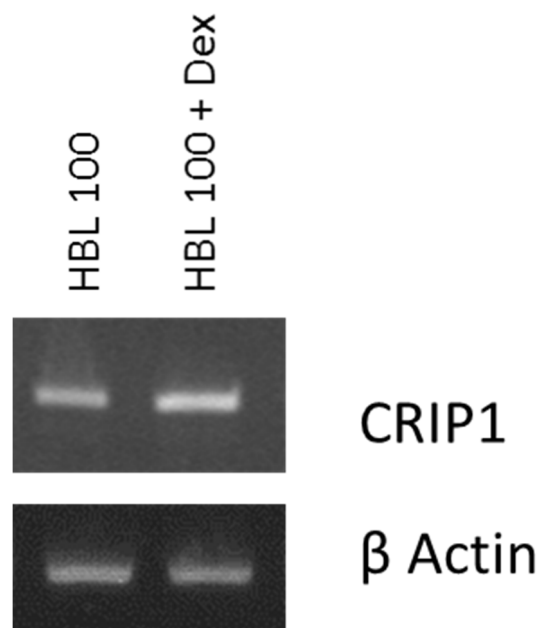


Abb. 17: CRIP1-Expression in der Mammarkarzinomzelllinie HBL-100 mit und ohne Dexamethason (100 nM).

3.3.5 Zebularin

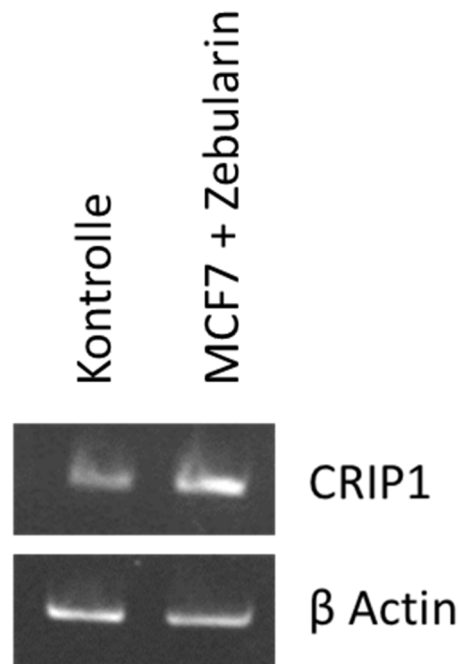


Abb. 18: Zebularin-Effekt (50 mg/ml) nach 48 Stunden Inkubation in der CRIP1-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MCF7.

Zebularin ist ein DNA-Methyltransferaseinhibitor und supprimiert Tumorstadium. Gleichzeitig fungiert es als Analogon für die Aminosäure Cytidin und hemmt mit seiner Bindung an die aktive Bindungsstelle die Cytidin-Deamylase. Die Brustkrebszelllinie MCF7 wurde mit 50 mg/ml Zebularin für zwei Tage inkubiert. Die Ergebnisse weisen auf eine Hochregulation von CRIP1 durch Zebularin hin. Denkbar ist daher eine epigenetische Regulation von CRIP1. Dieser Aspekt sollte in künftigen Studien der Arbeitsgruppe auch in Zusammenhang mit der epigenetischen Regulation von LDOC1 weiter verfolgt werden.

3.3.6 Transforming Growth Factor β (TGF β)

Der TGF- β ist ein Zytokin aus der Familie der Wachstumsfaktoren, welches unterschiedliche Rollen in Bezug auf Zellwachstum und -proliferation einnehmen kann. Die Zelllinien T47D, MCF7 und HBL-100 wurden über Nacht mit TGF- β (10 ng/ml) inkubiert. Eine Veränderung der Expression von CRIP1 in den genannten Zelllinien war nicht zu erkennen.

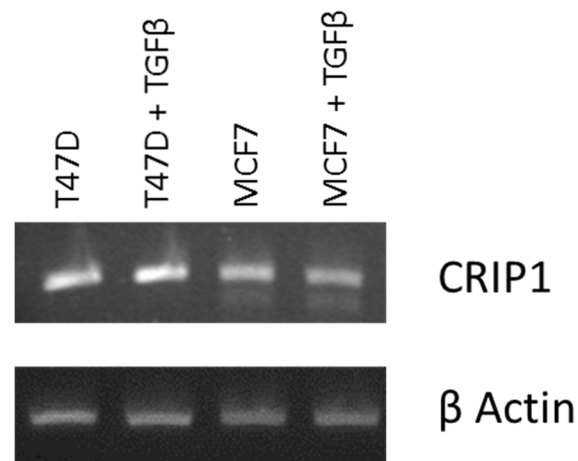


Abb. 19: TGF- β -Effekt (10 ng/ml) nach 12 Stunden Inkubation auf die CRIP1-überexprimierenden Brustkrebszelllinien T47D und MCF7.

3.4 CRIP1-Expressionsanalyse mittels PCR in Zervixkarzinomzelllinien

Wir führten explorativ mittels quantitativer PCR eine Analyse der Expression von CRIP1 in den Zervixkarzinomzelllinien CaSki, HeLa, SW756, Me180, C-33 A und SiHa durch. In diesen Zervixkarzinomzelllinien ließ sich eine stark variierende Expression beobachten. So scheint die CRIP1 Expression in CaSki, C33 A und SW756 im Gegensatz zu HeLa und SiHa erhöht. Die Plattenepithelkarzinomzelllinie SW756 zeigt die stärkste Bande. Weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf den Ursprung dieser Unterschiede in diesen Krebszelllinien wären daher von Interesse.

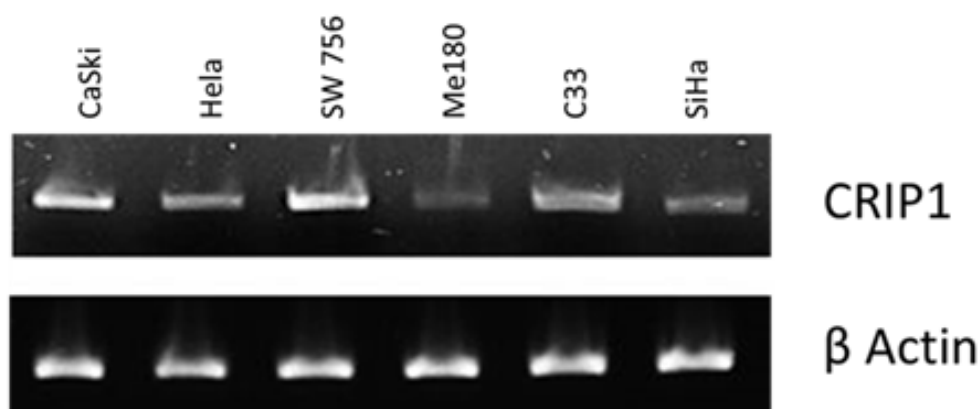


Abb. 20: PCR-Analyse der CRIP1-Expression in den Zervixkarzinomzelllinien CaSki, HeLa, SW756, Me180, C-33 A und SiHa.

3.5 Klonierung/Reexpression von CRIP1

In den oben beschriebenen Untersuchungen der Brustkrebszelllinien mittels semiquantitativer PCR und FACS-Analyse ging die Hypothese hervor, dass in entdifferenzierten Tumorzellen eine erhöhte Expression von CRIP1 stattfindet. Ein Zusammenhang zwischen der Her2/neu Expression und der Expression von CRIP1 war nicht erkennbar. Die genaue Rolle von CRIP1 in der Zelle bleibt unklar und ist somit auch in Brustkrebszellen nicht weiter erforscht. Mit der Absicht, ein erstes Modell für die Untersuchung von CRIP1 im Hinblick auf Brustkrebszellen und auf die Auswirkungen einer Überexpression des Gens in diesen Zellen zu etablieren, wurde eine CRIP1-überexprimierende Zelllinie geschaffen. Hierzu wurde die cDNA einer Zelllinie extrahiert, von der eine hohe CRIP1-Expression bekannt ist (MDA-MB-453), und in eine Zelllinie eingesetzt, die keine hohe basale CRIP1-Expression aufweist (MCF7). Die Methodik der Klonierung wurde in Unterabschnitt 2.17 ausführlich geschildert. Hervorzuheben ist, dass die CRIP1-cDNA in ihrer gesamten Länge amplifiziert werden sollte und hierzu zunächst eine PCR mit bestimmten CRIP1-Primern, dem sog. Full-Length-Primer-Paar (Unterabschnitt 2.6, Tabelle 3), und der cDNA der entsprechenden Zelllinie durchgeführt wurde. Das somit entstandene PCR-Produkt wurde daraufhin in einen Plasmidvektor integriert und in kompetente *E.-coli*-Bakterien transferiert. Durch das in dem Plasmidvektor enthaltene Resistenzgen gegen Ampicillin konnten auf dem ampicillinhaltigen LB-Agar nur die Bakterien wachsen, die den Vektor aufgenommen hatten. Unklar hierbei war jedoch ob die gewünschte CRIP1-cDNA korrekt in den Vektor integriert worden war. Deswegen war es notwendig, die Plasmide durch weitere PCR-Analysen zu screenen und zu selektieren. Es wurden darum mehrere der wachsenden Kolonien gepickt und in Nährmedium angezüchtet.

3.5.1 Selektion der CRIP1 überexprimierenden Bakterienkolonien

Das bloße Wachstum auf dem antibiotikahaltigem Nährmedium setzt wie oben erwähnt noch keine (korrekte) Insertion des CRIP1 Fragments in den Plasmid voraus. Hat eine Insertion des gewünschten PCR Produktes in richtiger Richtung (3' zu 5') stattgefunden ist ein adäquates Ablesen und eine Expression des Gens möglich. Wird die cDNA in 5'-3' Richtung eingefügt, so ist ein Ablesen der Sequenz nicht möglich und die fehlende Expression des Zielgens die Folge. Dies ist ebenfalls der Fall, wenn nur Teile des Fragments im Plasmid integriert werden oder sich ein Plasmid spontan wieder verschließt ohne das Fragment aufgenommen zu haben. Eine Selektion der entsprechenden Bakterienkolonien erfolgte über die Durchführung einer PCR mit Aliquots von kurz aufgekochten Bakteriensuspensionen und den im Kit enthaltenen T7- und BGH-reverse-Primer (vgl. Tabelle 3, Unterabschnitt 2.6 und Abb. 21).

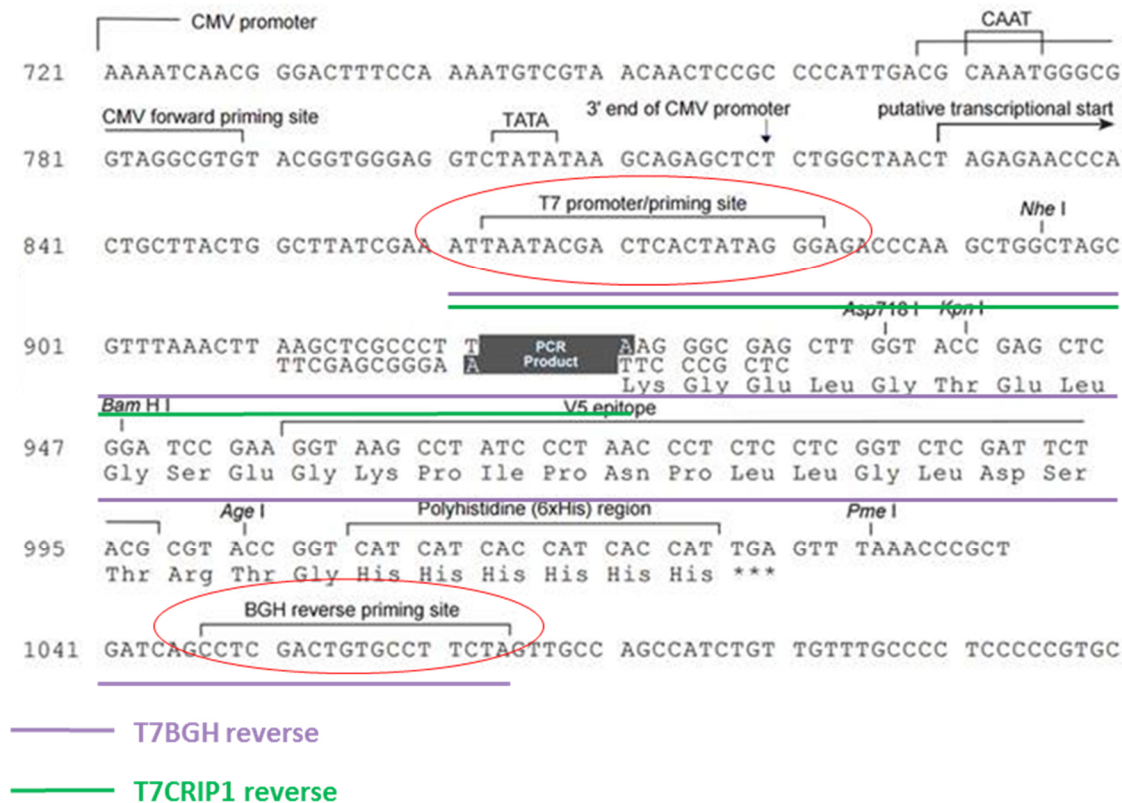


Abb. 21: Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des TOPO-Vektors.

Farblich markiert zur besseren Veranschaulichung sind die mit den Primern detektierbaren Abschnitte. Copyright ©Life Technologies Corporation 2009, mit freundlicher Genehmigung.

Die so ausgewählten Bakterienkolonien (1,2,3,4,5) verfügten über den Plasmid mit dem PCR Produkt (Abb. 22 A). Bei der Bakterienkolonie 9 könnte es sich um eine doppelte Insertion des Plasmids handeln, die somit zu einer längeren DNA-Sequenz und einem höheren Molekulargewicht führt. Im Anschluss erfolgte die weitere Differenzierung, bei welchem Klon die Insertion in korrekter Richtung eingeführt worden war. Dies geschah durch die Verwendung des spezifischen CRIP1-Rückwärtsprimers (3'-zu-5'-Richtung) und des T7-Vorwärtsprimers (vgl. Abb. 21). So wurden die Kolonien mit dem korrekt inserierten cDNA-Abschnitt detektiert (Abb. 22 B). Die im Anschluss über das NucleoSpin Plasmid Kit gereinigten Plasmide (siehe Unterabschnitt 2.20) wurden zur Kontrolle nochmals aufgetragen. Aufgrund des hohen Molekulargewichts liefen sie wie abgebildet sehr hoch im Gel (Einlauf ins Gel nur kurz nach der Ladestelle). In Abb. 22 sieht man, dass die Klone 3, 4 und 5 das Plasmid mit dem korrekt inserierten Abschnitt trugen. Die Vektoren konnten nun gezielt aus diesen Klonen isoliert werden. Letztlich wurde Klon 5 für die weitere Arbeit verwendet, da dieser nach Durchführung der Plasmidpräparation in entsprechend hoher Konzentration vorlag.

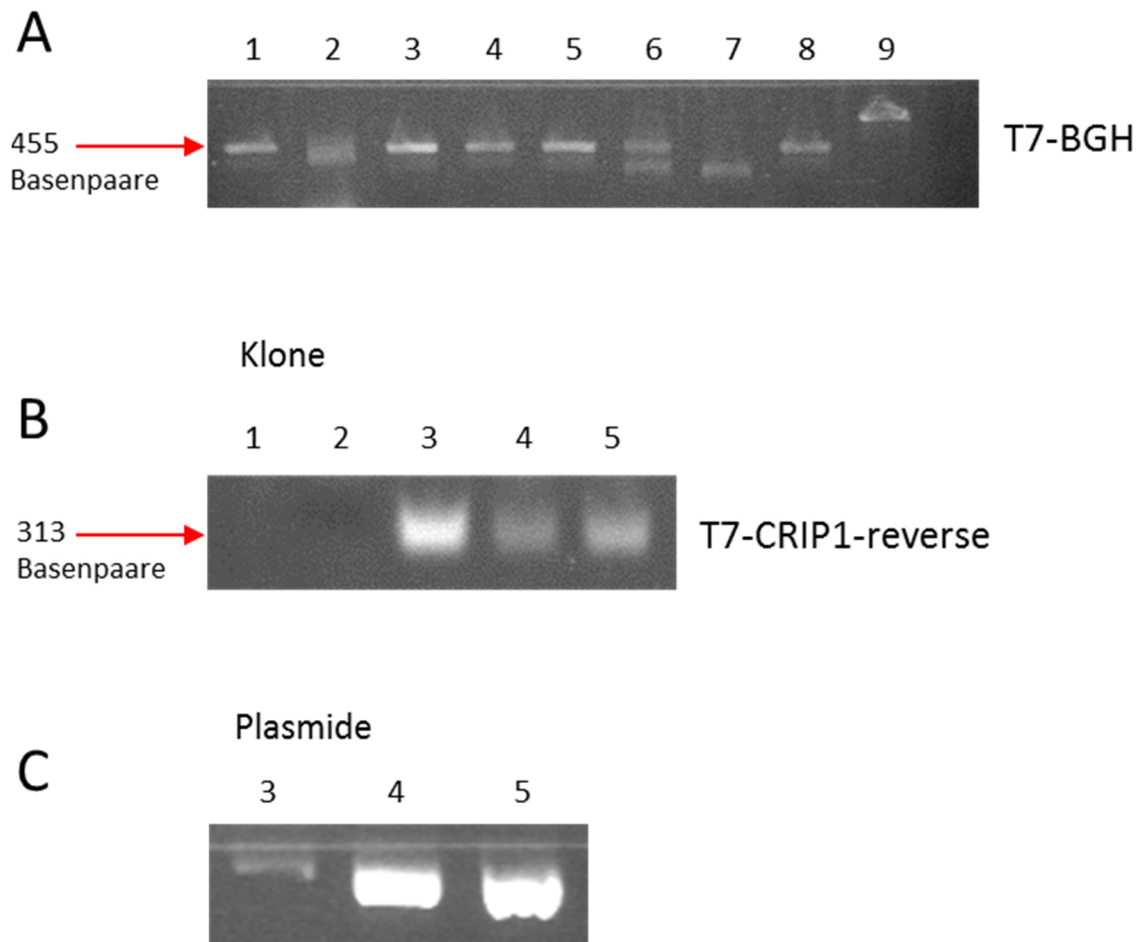


Abb. 22: Auswahl der Kolonien, die ein Plasmid aufgenommen haben.

A: PCR mit T7- und BGH-Primer. B: PCR mit dem T7- und CRIP1-reverse-Primer zur Auswahl der Plasmide mit den Inserts in richtiger Orientierung. C: Gereinigte Plasmide.

3.6 CRIP1 in dem CRIP1-V5-überexprimierenden, stabilen Zellklon der Zelllinie MCF7

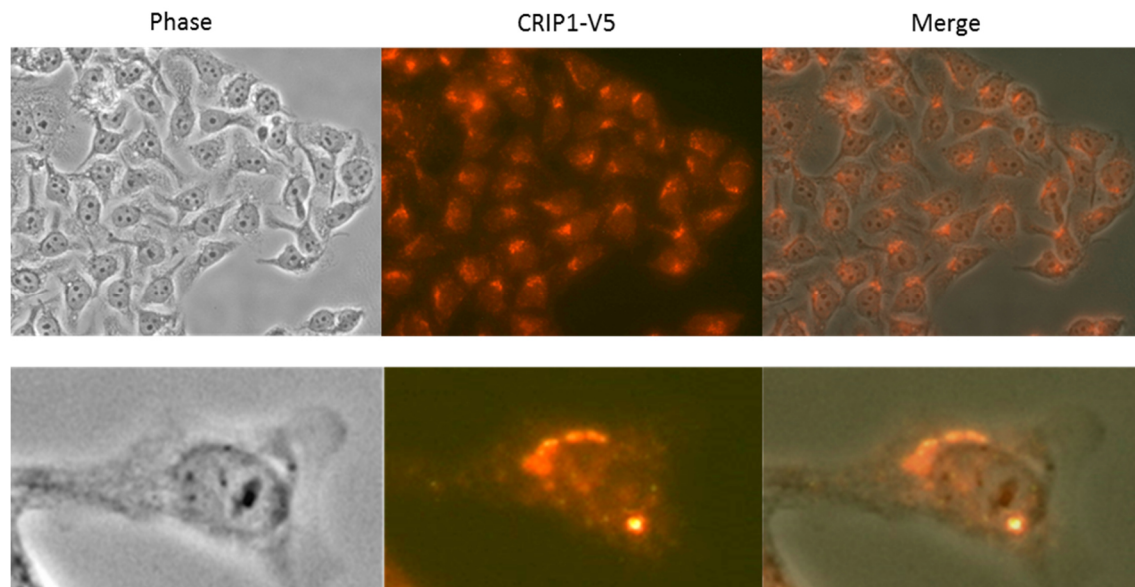


Abb. 23: Der mit dem CRIP1-V5-Expressionsplasmid transfizierte stabile Zellklon der Zelllinie MCF7.

Unten: Vergrößerung. Primärer Antikörper: Maus-anti-V5-tag-Antikörper. Sekundärer Antikörper: Cy3-konjugiertes Ziegen-anti-Maus IgG.

Die transiente Transfektion von Zielgenen in Form eines Plasmids ermöglicht die weitere Untersuchung der Auswirkungen einer entsprechenden Überexpression des Gens in der Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine transiente Transfektion problemlos mit HeLa-Zellen. Die transiente Transfektion mit MCF7-Zellen hingegen war nur schlecht möglich (geringe Transfizierbarkeit). Im Laufe dieser Arbeit stellten wir daher einen stabilen Zellklon mit MCF7-Zellen her. Das CRIP1-V5-Expressionsplasmid wurde wie in Unterabschnitt 2.17. beschrieben erstellt. Es verfügt über eine spezielle Aminosäuresequenz, das sog. Epitop V5. Das Epitop V5 des in Unterabschnitt 2.17.1 dargestellten Plasmids machte eine indirekte Fluoreszenzmarkierung durch entsprechende Antikörper möglich (primärer monoklonaler Antikörper Anti-V5, sekundärer Cy3-konjugierter Antikörper). Um die Funktionalität des Plasmids zu testen, führten wir eine indirekte Immunfluoreszenz durch. Hierbei war es ebenfalls möglich, von der zellulären Lokalisation von CRIP1 Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von CRIP1 in der Zelle zu ziehen. In den generierten CRIP1-V5-überexprimierenden Zellklonen der Tumorzelllinie MCF7 ließ sich eine verstärkte Färbung im Bereich des Golgi-Apparates nachweisen und bestätigte die zuvor erwähnte Beobachtung von einer perinukleären Lokalisation von CRIP1.

3.7 Zytokin-Antikörper-Array

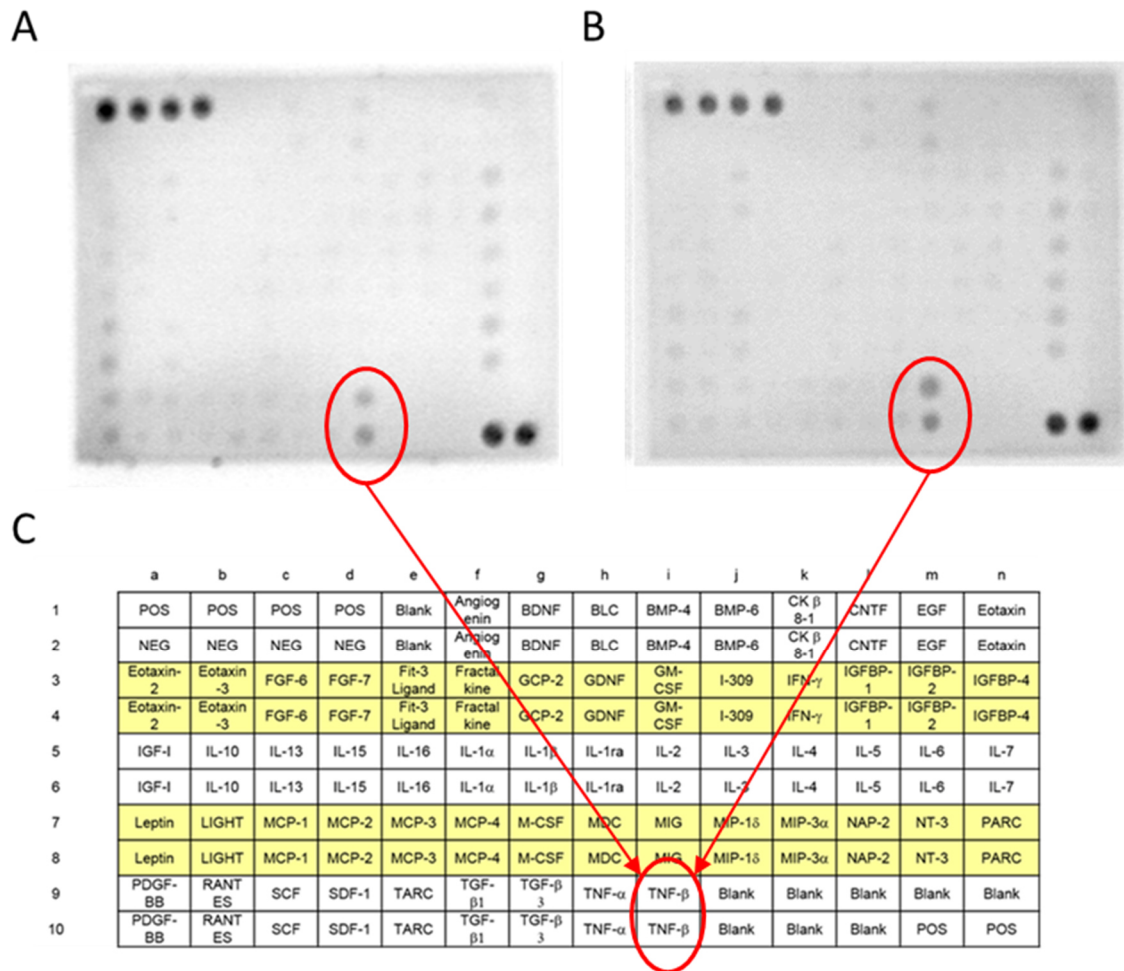


Abb. 24: Zytokinarray.

(A) Kontrolle mit kultivierter MCF7-Zelllinie. (B) CRIP1-V5-überexprimierende Zelllinie MCF7. (C) Tabelle zur Auswertung. Zur Verfügung gestellt von ©RayBiotech. Es ließ sich eine verstärkte Expression von TNF-β in der CRIP-V5-überexprimierenden Zelllinie MCF7 nachweisen.

Die von uns generierten MCF7-CRIP1-V5-Klone zeigten gegenüber der Ausgangszelllinie MCF7 keinerlei Auffälligkeiten in der Morphologie oder im Wachstumsverhalten. Es wurde jedoch beobachtet, dass eine Überexpression von CRIP1 mit einer Veränderung des Zytokinexpressionsmusters einhergehen kann (Lanningham-Foster et al. 2002). Um Hinweise auf die Funktion von CRIP1 im Hinblick auf immunologische Prozesse zu erlangen, wurde mithilfe der zuvor hergestellten CRIP1-V5-überexprimierenden Zelllinie MCF7 ein Antikörperarray durchgeführt. Die Kontrolle fand mit der regulären kultivierten Zelllinie MCF7 statt. Im Array war im Vergleich zu anderen Feldern (und den entsprechenden Zytokinen) eine verstärkte Färbung im Feld des Tumornekrosefaktors-β (TNF-β) zu erkennen. TNF-β, auch Lymphotoxin-α (LT-α) genannt, ist ein Zytokin, das vorwiegend von

Leukozyten und aktivierten Lymphozyten, aber auch von Tumorzellen sezerniert wird. Er bindet an die gleichen Rezeptoren wie der Tumornekrosefaktor- α und setzt proinflammatorische Signalkaskaden in Gang. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen TNF- β und CRIP1 besteht, muss Gegenstand zukünftiger Versuchsreihen sein und sollte durch zusätzliche Techniken wie ELISAs bestätigt werden. Eine vermehrte Expression von TNF- β in einer CRIP1-überexprimierenden Zelllinie unterstützt jedoch die Vermutung, dass CRIP1 eine Rolle in immunmodulatorischen Prozessen spielt.

3.8 LDOC1

Im Rahmen der Arbeitsgruppe des Labors in der Maistraße, in der vor allem Onkogene und Tumorsuppressorgene im Hinblick auf Karzinome der weiblichen Organe von Interesse waren, beteiligte ich mich nach erfolgreichem Abschluss der CRIP1-Klonierung an einer weiteren Klonierung – der von LDOC1.

3.8.1 Klonierung und Expression von LDOC1

Eine Überexpression von LDOC1 wurde bereits mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert (Inoue et al. 2005). Um die Auswirkungen einer LDOC1-Überexpression in gynäkologischen Tumorzellen untersuchen zu können, wurde ein LDOC1-V5-Expressionsplasmid generiert, dessen V5-Tag es möglich machte, die LDOC1-Expression in den transfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz darzustellen (Abb. 25 A).

Wie bereits für die Klonierung von CRIP1 beschrieben, wurde auch für LDOC1 die entsprechende Sequenz aus einer cDNA-Bank amplifiziert. Hierzu verwendet wurden die in Abschnitt 2.6 aufgeführten Primer und eine cDNA-Bank von HeLa-Zellen, die von der Arbeitsgruppe im Labor bereits für andere Experimente benutzt worden war. Das PCR-Produkt wurde in den pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektor eingefügt und in Zervixkarzinomzellen transferiert. Die im Anschluss fixierten Zellen konnten mittels Immunfluoreszenz weiter untersucht werden (Abb. 25 A). Während die Klonierung als Teil dieser Arbeit betrachtet werden kann, so waren die weiterführenden Untersuchungen eine Gemeinschaftsarbeit des Forschungslabors und unter Buchholtz et al. veröffentlicht worden (Buchholtz et al. 2013). Zum Vergleich wurden von mir zunächst kommerziell erhältliche Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland; Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Abcam, Cambridge, UK) an Zellen diverser Zelllinien getestet. Einige Publikationen beschrieben negative Erfahrungen mit kommerziell erhältlichen Antikörpern (Mizutani et al. 2005; Duzkale

et al. 2011). Auch im Rahmen dieser Arbeit zeigten die genannten Antikörper keine entsprechende Fluoreszenz, auch nicht in den LDOC1-V5-überexprimierenden Zellen. Die Reaktion auf das V5-Epitop wies jedoch eine deutliche Reaktion nach (Abb. 25 A).

3.8.2 Überexpression von LDOC1 induziert Zelltod in Zervixkarzinomzelllinien

Es wurden stabile Zellklone mit den Zelllinien HeLa, Me180 und C-33 A erstellt. Bei den genannten Zellklonen, einschließlich der Hela-Zellen, fielen morphologische Veränderungen auf. Die Klone – im Gegensatz zu den Erfahrungen mit CRIP1 – stellten jedoch nach mehreren Passagen das Wachstum ein. Wurde das Expressionsplasmid nur transient in HeLa-Zellen übertragen, so zeigten diese unter dem Fluoreszenzmikroskop eine veränderte Morphologie und eine vermehrte Apoptoserate (Abb. 25 A). Ebenfalls ließ sich LDOC1 in diesen Zellen sowohl innerhalb des Zellkerns als auch im Zytoplasma nachweisen. HeLa-Zellen sind bekannt für eine hohe Transfektionsrate, das LDOC1-V5-Expressionsplasmid zeigte jedoch eine erschwerte Transfektion in nur wenige Zellen. Mögliche Erklärungen hierfür sind ein zu rasches Absterben der transfizierten Zellen oder eine Interferenz von anderen zellulären Mechanismen, die auf die Expression von LDOC1 einwirken. Es wurde eine Kontrolltransfektion mit dem Transfektionsfaktor MTA1 (metastasis-associated protein 1) durchgeführt, in der sich die Zellen im Gegensatz dazu morphologisch unverändert und die Transfektionsrate wesentlich höher zeigten. Diese Unterschiede zeigten sich sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in den durchgeführten Western Blot Analysen (Abb. 25 B). Die genannten Beobachtungen weisen darauf hin, dass LDOC1 einen wachstumshemmenden Einfluss ausübt und eine Überexpression zu einer erhöhten Apoptoserate führt. Die in Abb. 25 gezeigten Ergebnisse sind als Produkt der Gemeinschaftsexperimente unter Buchholtz et al. (2013) veröffentlicht und für die anschließende Diskussion von Bedeutung.

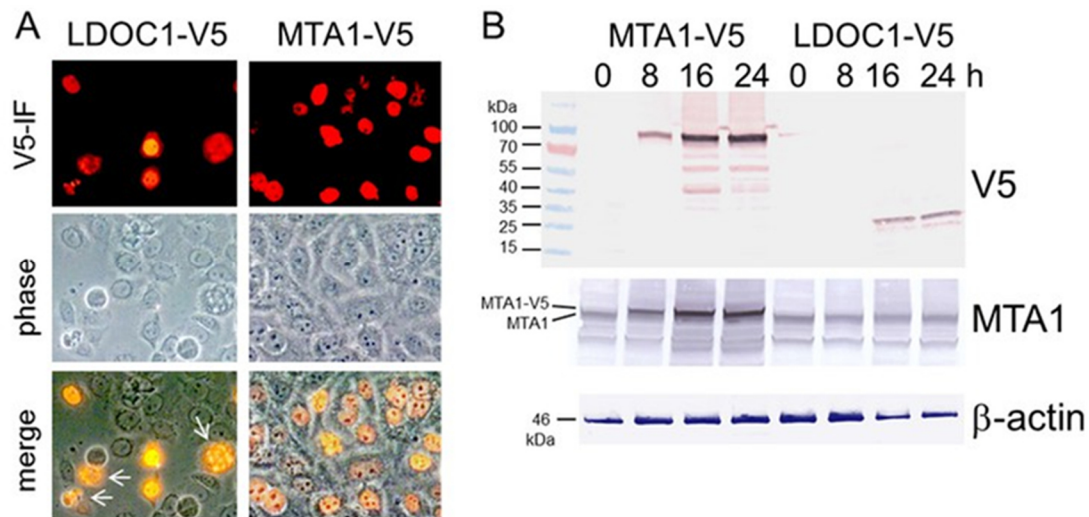


Abb. 25: Ektopische Überexpression von LDOC1 induziert Apoptose in HeLa-Zellen.

(A) Indirekte Immunfluoreszenz. Transient mit dem LDOC1-V5- oder dem MTA1-V5-Expressionsplasmid transfizierte HeLa-Zellen nach Inkubation für 48 Stunden. Apoptotische Zellen sind mit einem Pfeil markiert. (B) Western Blot Analyse mit transfizierten HeLa-Zellen. Die Transfektion mit einem LDOC1-V5- oder einem MTA1-V5-Expressionsplasmid erfolgte über unterschiedliche Zeitspannen. Marker: prestained marker IV (Peglabor, Erlangen, Deutschland). LDOC1 = 17 kDa (146 AA); MTA1 = 81 kDa (715 AA); V5-His-Tag = 45 zusätzliche AA (AA = Aminosäure; kDa = relatives Molekulargewicht).

4 Diskussion

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang des brustkrebs-assoziierten Her2/neu-Proteins mit CRIP1 zu untersuchen. Im Hinblick auf die durchgeführten Experimente war ein solcher direkter Zusammenhang nicht erkennbar. Es folgte daher eine Expressionsanalyse von CRIP1 mittels PCR und FACS-Analyse in unterschiedlichen Brustkrebszelllinien, in der sich eine Überexpression von CRIP1 in höhermalignen, undifferenzierten Zelllinien feststellen ließ.

4.1 CRIP1 und Her2/neu – ein Zusammenhang?

CRIP1 wurde ursprünglich in Dünndarmzellen der Maus identifiziert (Birkenmeier und Gordon 1986). In Bezug auf Krebszellen wurde eine Überexpression in Brustkrebs- und Zervixkarzinomzellen (Ma et al. 2003; Liu et al. 2004; Santin et al. 2005), Prostata- und Pankreaskarzinomzellen (Wang et al. 2007; Terris et al. 2002) sowie in Kolorektalkarzinomzellen (Groene et al. 2006) nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe um Rauser et al. (2010) und Ludyga et al. (2013) legte via MALDI-Imaging eine Korrelation zwischen Her2/neu-überexprimierenden Zellen und der Hochregulation von CRIP1 in diesen Zellen nahe. Dies war bereits zuvor in Form von cDNA-Microarrays von Mackay et al. (2003) und Wilson et al. (2002) beschrieben worden. Her2/neu ist ein Wachstumsfaktorrezeptor und in ca. 25 % der Mammakarzinome überexprimiert (Hiddemann 2010). Unter anderem trägt Her2/neu zur Metastasierung eines Tumors bei und ist ein negativer Prognosefaktor (Li et al. 2004). Mit der Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab ergaben sich große Fortschritte bezüglich der Therapie eines Her2/neu-positiven Tumors (Piccart-Gebhart et al. 2005). Die Entwicklung dieser neuen, auf den genetischen Defekt ausgerichteten Therapeutika ist Gegenstand vieler aktueller Forschungsgruppen. Her2/neu-positive Tumoren sprechen jedoch nicht immer auf die spezifische Therapie an (Gajria und Chandrarlapaty 2011). Es existiert daher der Bedarf, andere Marker und interagierende Proteine zu identifizieren, damit alternative zielgerichtete Medikamente entwickelt werden können. In 14 von insgesamt 116 untersuchten Tumorarten fand sich eine hohe Expression von CRIP1 (Ludyga et al. 2013). In Brustkrebsgewebe korrelierte das Vorhandensein einer Her2/neu-Überexpression mit einer CRIP1-Überexpression. Ein Zusammenhang zwischen einer CRIP1-Überexpression mit der Tumorgroße, der Anzahl der befallenen Lymphknoten oder dem Progesteron-Rezeptor-Status ergab sich laut Ludyga et al. (2013) nicht. Es ließ sich

jedoch eine signifikante Korrelation einer CRIP1-Überexpression und einem besseren klinischen Verlauf feststellen. In der genannten Arbeit wurden weiterhin drei Tumorzelllinien identifiziert, die eine ähnlich hohe Expression von Her2/neu und CRIP1 aufweisen: T47D, BT474 und MDA-MB-361.

In unseren Untersuchungen an der Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten die beiden Proteine Her2/neu und CRIP1 eine starke Anreicherung. MDA-MB-453 ist vorbeschrieben als eine Mammakarzinomzelllinie mit Her2/neu-Überexpression (Subik et al. 2010; Mackay et al. 2009; Arriola et al. 2008). Wir sahen daher die oben genannte Hypothese auf zellbiologischer Ebene zunächst bestätigt. Wir bedienten uns zur weiteren Expressionsanalyse der FACS-Analyse und verglichen die Expressionsmuster von CRIP1 und Her2/neu in unterschiedlichen Brustkrebszelllinien (T47D, MCF7, MDA-MB-453, -231 und -435). Eine ähnlich hohe Expression von CRIP1 und Her2/neu konnten wir, wie beschrieben, in der Zelllinie T47D finden. Eine Überexpression beider Proteine in der Zelllinie MDA-MB-453 ließ sich bestätigen. Insgesamt zeigte sich in fast allen untersuchten Krebszelllinien unserer Studie eine hohe CRIP1-Expression. Eine entsprechende Korrelation der CRIP1 Expression mit der Her2/neu-Expression in diesen Zelllinien konnten wir jedoch nicht nachweisen.

Es wurde ein positiver Zusammenhang von CRIP1 im Hinblick auf die Prognose bei Brustkrebs (Ludyga et al. 2013) und Osteosarkomen (Baumhoer et al. 2011) beschrieben. Balluff et al. (2011) wiederum erwähnen CRIP1 als negativen prognostischen Faktor beim Magenkarzinom. Die Möglichkeit der Verwendung von CRIP1 als Biomarker für Screeningverfahren und Prognosestellungen wurde in diesen Arbeiten diskutiert. Im Vergleich der CRIP1 Expression in gesunden und tumorösen Geweben fiel in unseren Untersuchungen wie bereits oben erwähnt eine Überexpression in den stärker malignen Zellen auf. In unserer FACS-Analyse von unterschiedlichen Brustkrebszelllinien und der nicht tumorösen Zelllinie MCF10A ließ sich beobachten, dass die als hochmaligne eingestufteten entdifferenzierten Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 eine höhere Expression von CRIP1 aufweisen als die anderen getesteten Zelllinien. CRIP1 könnte also eine Rolle in der Entdifferenzierung von Tumorzellen, demnach in der Tumorprogression spielen und ist als prognostischer Marker denkbar. Dementsprechend war die Expression von CRIP1 in der Epithelzelllinie der Brustdrüse MCF10A am niedrigsten. Die ebenfalls erhöhte Expression in der mesenchymalen Zelllinie HBL-100 lässt wiederum eine Rolle von CRIP1 in der sogenannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) vermuten, welche die Umwandlung einer Epithelzelle in eine Zelle vom mesenchymalen Phänotyp beschreibt (Kaufmann 2011).

Mesenchymzellen sind pluripotent (Kalluri und Neilson 2003). Physiologisch ist dieser Vorgang z. B. bei der Wundheilung und im Rahmen der Embryogenese zu finden. Im Hinblick auf die Karzinogenese wurde die EMT in unterschiedlichen Untersuchungen als entscheidender Mechanismus für die Entstehung eines malignen Prozesses in Epithelgeweben diskutiert (Kalluri und Weinberg 2009). Die genauen Interaktionen, die hierbei eine Rolle spielen sind bislang jedoch unklar. Der Fokus neuerer Untersuchungen liegt daher auf Biomarkern der EMT. Es wurde gezeigt, dass diese Biomarker (wie z. B. die Expression des filamentösen Proteins Vimentin oder der Glykoproteine Osteonectin und N-Cadherin) eine höhere Expression in invasiven Karzinomen vorweisen als im duktalem Carcinoma in situ (Choi et al.). Weitere Studien legen nahe, dass Triple-negative Mammakarzinome aus dem mesenchymalen Zelltyp entstehen, und beschreiben eine Assoziation zwischen der EMT und einem höheren Grading, demnach histologisch ent- oder undifferenzierten Tumorzellen (Jeong et al. 2012). Da unsere Versuche eine Rolle von CRIP1 in der Tumorprogression und in der EMT nahelegen (hohe Expression in triple negativen Zelllinien und der HBL-100 Myoepithelzelllinie), wären nähere Untersuchungen in diesem Zusammenhang von Interesse und könnten CRIP1 als weiteren Marker identifizieren.

Mittels RT-PCR und FACS-Analyse untersuchten wir neben Mammakarzinomzelllinien auch Zervixkarzinomzelllinien (SiHa, Caski, Hela, Me180 und C-33 A) und ebenfalls leukämische Zellen (Jurkat, IM9, HL60; Ergebnisse nicht dargestellt). In allen genannten Zelllinien fand sich eine nachweisbare, teilweise sehr hohe CRIP1 Expression. Im Hinblick auf die Zervixkarzinomzelllinien ließ sich unsere oben erwähnte Beobachtung von einer erhöhten Expression in entdifferenzierten Tumorzellen bestätigen. In den Tumorzelllinien CaSki, C33 A und SW756 zeigte sich die CRIP1-mRNA-Expression erhöht. Diese Beobachtung unterscheidet sich von der relativ einheitlich erhöhten CRIP1-Expression in den untersuchten Brustkrebszelllinien. Die weiterführende Untersuchung dieser Zelllinien und ihrer Unterschiede ist ein Ansatz um an weitere Hinweise auf die Funktion von CRIP1 in Tumorzellen zu gelangen. Die semiquantitative RT-PCR vereinfachte nach ihrer Entdeckung die Transkriptionsanalyse wesentlich (Mullis 1990). Jedoch hat diese Methode den Nachteil, dass die Bandenintensität keine sehr exakte Quantifizierung des Zielgens ermöglicht. In der von uns mittels RT-PCR durchgeführten Expressionsanalyse von CRIP1 und Her2/neu in unterschiedlichen Brustkrebszelllinien ließen sich keine gut quantifizierbaren Daten erheben, sodass wir die oben beschriebene FACS-Analyse durchführten. Hier war im Gegensatz zur RT-PCR eine genauere Quantifizierung möglich, da Zellzahl und Menge des Zielgens ins Verhältnis zu setzen waren. Mittels eines für die Real-time PCR geeigneten Sonden-Primers (siehe Tabelle 3) konnte zum Schluss der Doktorarbeit in Zusammenhang mit einem

seinerzeit im Labor neu bereitstehenden Real-time PCR Geräts (Applied Biosystems) eine besser quantifizierbare PCR Methode aufgebaut werden. Die Methode konnte routinemäßig jedoch erst von nachfolgenden Doktoranden genutzt werden. In Bezug auf die Regulation von CRIP1 verblieben wir mit der RT-PCR und bestätigten die daraus resultierenden Ergebnisse im Verlauf mittels FACS-Analyse, welche die letztlich deutlich wichtigere Proteinebene zeigte. Problematisch erwies sich der Nachweis unserer Beobachtungen auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse. Die Versuche einer Western Blot Analyse mit den vorhandenen CRIP1 Antikörpern scheiterten. Ähnliche Erfahrungen wurden uns zuvor von der Arbeitsgruppe von Prof. Axel Walch berichtet. Als Ursache wurde ein mögliches Durchblotten des sehr kleinen CRIP1-Proteins vermutet und wahrscheinlich auch eine Epitopauflösung während der Denaturierung im Rahmen des Western Blot Verfahrens. Diese fällt bei der FACS-Analyse und bei der indirekten Immunfluoreszenz deutlich geringer aus. Im Gegensatz zum Western Blot Verfahren bleibt dabei die Proteinsekundärstruktur meist erhalten.

4.2 CRIP1 Regulation

Zur weiteren Analyse der CRIP1-Expression in Mammakarzinomzelllinien bedienten wir uns unterschiedlicher Modulatoren. Heregulin ist ein Wachstumsfaktor, der an die ErbB-Rezeptorfamilie bindet (ErbB3/4). Er setzt damit Signalkaskaden in Gang, die auf unterschiedlichste Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Invasion Einfluss haben. Er wird mit der Entstehung verschiedener Tumoren und einer schlechten Prognose assoziiert (Breuleux 2007). Eine Expression ist in ca. 30 % aller Mammakarzinome zu finden (Khurana et al. 2014). Neuere Theorien besagen, dass Heregulin auch außerhalb seiner Wirkung auf die ErbB-Rezeptorfamilie eine Rolle in der Kanzerogenese spielen könnte (Khurana et al. 2014). Der Epidermal Growth Factor (EGF) ist ebenfalls ein Wachstumsfaktor und bindet an den sog. EGF-Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors und die dadurch ausgelöste Signalkaskade scheint im Zusammenhang mit der EMT, mit Zellmigration und Tumoringression zu stehen und eine Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika zu bewirken (Masuda et al. 2012). Bezüglich der Signaltransduktion zwischen Zelloberfläche und Nukleus ist im Hinblick auf die EMT bislang wenig bekannt. Ein genaueres Verständnis wäre für die Behandlung mit EGFR-Inhibitoren von Vorteil, da es Untersuchungen gibt, die eine Überexpression des Rezeptors in triple negativen und inflammatorischen Mammakarzinomen belegen (Davis et al. 2014; Jeong et al. 2012). Diesbezüglich fehlen jedoch die entsprechenden Biomarker für eine individuelle Therapieeinschätzung. Der Tyrosinkinaseinhibitor

Lapatinib (Tykerb, Tyverb, GlaxoSmithKline) wird zur sog. „targeted therapy“, also zur gezielten Therapie beim Her2/neu-positiven Mammakarzinom angewendet. Neuere Studien beobachteten einen synergistischen Effekt von Lapatinib und dem Zytostatikum Capecitabin bei metastasierten Tumoren, die auf eine Therapie mit Trastuzumab nicht ansprachen (Cetin et al. 2014). Weitere Studien zeigen ebenfalls einen therapeutischen Effekt bei bestimmten Formen des Endometriumkarzinoms (Konecny et al. 2008). Lapatinib bindet als Ligand an den Her2/neu und an den EGF Rezeptor und verhindert eine Signalweiterleitung (Nelson und Dolder 2006). Sorafenib (Nexavar, Bayer AG) ist ein Proteinkinaseinhibitor, dessen größter Effekt die Inhibierung des Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma), zu sein scheint (Murphy et al. 2006). Das Raf-Protein gehört zu einer Familie von Proteinkinasen und ist Teil des MAP-Kinase-Signalwegs und des Ras-Raf-Signalwegs. Diese Signalwege sind essentiell für das Wachstum und die Differenzierung einer Zelle (Kolch 2000). In der klinischen Anwendung hemmt Sorafenib vor allem die Angiogenese und ist für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms, des Hepatozellulären Karzinoms und des Schilddrüsenkarzinoms zugelassen (Zafrakas et al. 2016). Bezüglich des therapeutischen Effekts im Hinblick auf das Mammakarzinom wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die gegen eine Monotherapie mit Sorafenib sprechen (Zafrakas et al. 2016). In Kombination mit Gemcitabin oder Capecitabin scheint Sorafenib wiederum einen therapeutischen Effekt zu haben (Schwartzberg et al. 2013).

In unseren Untersuchungen der CRIP1 Expression in der Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 und in den Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D ergaben sich keine Hinweise einer medikamentösen Regulation durch die Inhibierung des Her2/neu- bzw. EGF-Rezeptors (Lapatinib) noch durch die Stimulation mit Heregulin und EGF. Dies stellt einen weiteren Hinweis dar, dass CRIP1 und Her2/neu keinen funktionellen Zusammenhang zu haben scheinen. Zu bedenken ist, dass unterschiedliche Tumorzelllinien über eine unterschiedliche hohe Expression der Zielrezeptoren verfügen (Konecny et al. 2006). Die Arbeitsgruppe vom Konecny stellte fest, dass Lapatinib auf alle 31 untersuchten Brustkrebszelllinien einen antiproliferativen Effekt hatte, dieser jedoch stark von der verwendeten Konzentration abhängig war. Dies wiederum sei auf die variierende Expression der Her2/neu- und EGF-Rezeptoren zurückzuführen. Um unsere Ergebnisse zu bestätigen, wäre daher eine Studie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lapatinib vonnöten.

In früheren Arbeiten wurde ein Einfluss von Dexamethason auf die mRNA-Synthese von CRIP1 in Gewebeproben und in kultivierten intestinalen Epithelzellen der Ratte beschrieben (Levenson et al. 1993). Glukokortikoide wirken antiinflammatorisch und immunsuppressiv

und sind gleichzeitig für eine Vielzahl immunmodulatorischer Prozesse innerhalb der Zelle verantwortlich (Franchimont 2004). In unseren Versuchsreihen ließ sich ein solcher Zusammenhang von Dexamethason und der CRIP1-Expression in den Zelllinien MDA-MB-453, MCF7 und T47D bei einer Konzentration von 100 nM Dexamethason nicht replizieren. Allerdings wurden die Untersuchungen von Levenson et al. vornehmlich mit Dexamethasonapplikation in vivo durchgeführt, teils auch in vitro an Epithelzelllinien des Dünndarms, nicht jedoch an Tumorzelllinien. Eine fehlende Hochregulation von CRIP1 in den oben genannten Brustkrebszelllinien könnte die Folge eines deaktivierten Glukokortikoidrezeptors sein. Ein Verlust des Glukokortikoidrezeptors in einigen Tumorarten ist beschrieben, u. a. auch in Mammakarzinomzellen (Vilasco et al. 2013). Gleichzeitig wird eine Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors mit einem Verlust der Apoptosefähigkeit in Brustkrebszelllinien beschrieben (Wu et al. 2005; Aziz et al. 2012). Von Interesse ist daher unsere Beobachtung, dass die CRIP1-Expression in der Zelllinie HBL-100 durch Dexamethason hochreguliert werden. Im Hinblick auf die oben genannten Untersuchungen deutet dies auf einen funktionierenden Glukokortikoidrezeptor in HBL-100-Zellen hin, was die Hypothese unterstützen würde, dass CRIP1 eine Funktion in der Immunmodulation und Tumorprogression einnimmt. Levenson et al. erklären ihre Ergebnisse damit, dass Glukokortikoide die Entwicklung der Enterozyten stimulieren, vor allem in der Neonatalperiode der Ratte. CRIP1 sei bei dieser Entwicklung beteiligt. Unklar blieb, ob die Zellen durch Dexamethason direkt zur gesteigerten Synthese von CRIP1 stimuliert wurden oder ob eine vermehrte Bildung von unreifen intestinalen Zellen und eine damit einhergehende erhöhte CRIP1-Syntheserate verantwortlich waren. Levenson et al. beobachteten einen Anstieg von 60 % nach einer Dosissteigerung auf insgesamt 5 µM und hält daher einen direkten Zusammenhang zwischen Dexamethason und der CRIP1-Expression für wahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit, unsere Ergebnisse zu erklären, ist, dass die Beobachtungen von Levenson et al. auf einen multifaktoriell bedingten Anstieg von CRIP1 durch Reifungsprozesse der Enterozyten zurückzuführen sind und nicht auf eine direkte Interaktion zwischen CRIP1 und Dexamethason. In Gewebeproben von erwachsenen Mäusen, die mit Dexamethason behandelt worden waren, konnte kein Anstieg der CRIP1-Expression festgestellt werden.

Unsere Untersuchungen mit Zebularin suggerieren eine Hochregulation von CRIP1 in der mit der Substanz behandelten Brustkrebszelllinie MCF7. Zebularin ist ein DNA-Methyltransferaseinhibitor und induziert epigenetische Veränderungen (Cheng et al. 2003). Weitere DNA-Methyltransferaseinhibitoren wie z.B. 5-Aza-2'-deoxycytidin und 5-Azacytidin

werden in der Klinik als Zytostatika eingesetzt, haben jedoch eine hohe Anzahl an Nebenwirkungen und müssen intravenös appliziert werden. Zebularin hat eine hohe orale Bioverfügbarkeit, ist eine stabilere Substanz und zeigt in Studien eine geringere Toxizität (Billam et al. 2010). Die DNA-Methylierung spielt zusammen mit anderen epigenetischen Prozessen, wie z.B. der Deacetylierung von Histonen eine wichtige Rolle in der Transkription von Genen (Rountree et al. 2001). Meist erfolgen DNA-Methylierungen im Bereich der Promotorregion an der Cytosin-Phosphat-Guanin(CpG)-Einheit. Eine Hypo- oder Hypermethylierung hat eine veränderten Genexpression zur Folge und kann, insbesondere im Hinblick auf Onkogene und Tumorsuppressorgene, die Tumorentstehung fördern (Baylin und Ohm 2006; Gaudet et al. 2003). Es wird davon ausgegangen, dass unter anderem diese epigenetischen Prozesse für die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich zu machen sind (Perez-Plasencia und Duenas-Gonzalez 2006). Im Gegensatz zur Genetik sind epigenetische Veränderungen potentiell reversibel. Zebularin wird daher als Substanz der Chemoprävention gehandelt (Huang et al. 2011). Vergleichbare Studien zur Behandlung von Brustkrebszelllinien mit Zebularin zeigten eine Inhibierung der Expression von Proteinen, die die Epigenetik in MCF7 Zellen beeinflussen (Billam et al. 2010). Ebenso verändert es zellregulatorische Prozesse und induziert die Apoptose in Brustkrebszellen. Diese Veränderungen scheinen abhängig von der Konzentration zu sein (Billam et al. 2010). Billam et al. vermutet, dass der epigenetische Einfluss und die Apoptoseinduktion separat voneinander zu sehen sind. In unseren Untersuchungen starben die Brustkrebszellen, die mit einer höheren Konzentration inkubiert wurden ab. Eine Hochregulation von CRIP1 in mit Zebularin vorbehandelten Zellen könnte darauf hinweisen, dass die CRIP1 Expression durch epigenetische Prozesse reguliert wird oder ein Teil der epigenetischen Regulation darstellt. Die epigenetische Regulation von CRIP1 und von LDOC1 wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

TGF- β ist ein Peptidhormon und ein endogener Inhibitor der Zellproliferation (Gold 1998). Studien zeigen, dass in vielen Tumorarten (u.a. Pankreas-, Colonkarzinom, Mammakarzinom) eine Überexpression des Zytokins zu finden ist. Höhergradig maligne Tumorzellen scheinen die Sensibilität für TGF- β zu verlieren. Die Mechanismen der Hochregulation sind heutzutage weitestgehend verstanden und werden unter dem sog. Smad-signaling-pathway beschrieben. Aktuelle Studien berichten über eine ambivalente Funktion von TGF- β in Brustkrebszelllinien (Buck und Knabbe 2006). So führt eine Therapie mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen zu einer Hochregulation von TGF- β , dieses verfügt aber in Abhängigkeit von Tumorstadium und Estrogenrezeptorstatus über tumorsuppressive

oder tumorprogressive Eigenschaften. Nach unseren Beobachtungen scheint eine Stimulation der CRIP1 Expression durch TGF- β in den Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D unwahrscheinlich.

4.3 CRIP1 als immunmodulatorisches Protein

Der an dem CRIP1-überexprimierenden Zellklon MCF7 durchgeführte Zytokinarray ergab den Hinweis auf eine erhöhte Expression von TNF- β (auch Lymphotoxin- α , LT- α , genannt) in dieser Zelllinie. TNF- β ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das von aktivierten Lymphozyten sezerniert wird. Er bindet, wie auch TNF- α , an Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1/2) und setzt proinflammatorische Signalkaskaden in Gang (Ruddle 2014).

Neuere Studien zeigen, dass Zytokine in Abhängigkeit von unterschiedlichsten Faktoren eine kanzerogene Wirkung haben können – sei es direkt in der Funktion eines Onkogens oder über die Bahnung eines prokanzerogenen zellulären Umfeldes (Bauer et al. 2012). Um die Unterschiede von TNF- α und LT- α zu erforschen, wurden Studien an Knock-out-Mäusen durchgeführt. Die Mäuse, in denen LT- α deaktiviert wurde, zeigten signifikante Defekte der sekundären lymphatischen Organe, wie fehlende Lymphknoten, fehlende Peyer-Plaques und eine dysfunktionale Milz (Togni et al. 1994; Liepinsh et al. 2006). In vorherigen Arbeiten ergaben sich Hinweise dafür, dass CRIP1 die Produktion von Zytokinen induziert (Cousins und Lanningham-Foster 2000). Weiterhin wurde CRIP1 eine Rolle in der zellulären Immunabwehr zugesagt. Es fand sich eine erhöhte Expression in lymphatischen Strukturen, wie z. B. peritonealen Makrophagen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Lymphozyten und Monozyten), Milz und Thymus (Levenson et al. 1993; Hallquist et al. 1996). Diese Untersuchungen lassen zusammen mit unserer Beobachtung eine Verbindung von CRIP1 und TNF- β vermuten. Diese sollte allerdings mithilfe weiterer Methoden, z.B. anhand von ELISA an einer größeren Bandbreite an Tumorzelllinien bestätigt werden. Erst dann wären Versuchsreihen mit den Lymphotoxin- α -Inhibitoren LT β R-Ig und Anti-LT- α -Antikörper (Fava et al. 2003; Chiang et al. 2009) ein Weg, um die Verbindung und die Funktion von CRIP1 weiter zu definieren. Auch eine Untersuchung des Einflusses des Medikaments Etanercept, welches die beiden proinflammatorischen Zytokine TNF- α und TNF- β bindet und damit inaktiviert, wäre von Interesse. Trotz einer scheinbar fehlenden Regulation von CRIP1 durch Dexamethason in Brustkrebszellen gemäß den Ergebnissen unserer Studie sind die Hinweise, die die Funktion von CRIP1 als immunmodulatorisches Protein stützen, nicht von der Hand zu weisen.

4.4 CRIP1 Lokalisation

In unserer Immunfluoreszenzanalyse von Tumorzelllinien zeigte sich CRIP1 stets perinukleär im Bereich des Golgi-Apparates. Wir untersuchten diesbezüglich die Krebszelllinien MDA-MB-453 und TC7, aber auch die Brustkrebszelllinien T47D und MCF7 (Ergebnisse nicht dargestellt) sowie den von uns generierten stabilen CRIP1-überexprimierenden Zellklon von MCF7-Zellen. Unsere Beobachtungen weisen auf eine massive Sekretion von CRIP1 in diesen Zellen hin. Als Protein mit einer Zinkfingerdomäne ist es stabil genug, um mit Nukleinsäuren zu interagieren (Cousins und Lanningham-Foster 2000). Neben der oben diskutierten Funktion eines immunmodulatorischen Proteins gab es auch die Vermutung, CRIP1 könne an der Kommunikation zwischen Zytosol und Nukleus beteiligt sein. Unsere Beobachtung der Lokalisation am Golgi-Apparat bestätigt jedoch eher die Hypothese, dass CRIP1 ein sekretorisches Protein und an der auto- und parakrinen Signaltransduktion beteiligt ist. Letztlich ist eine pleiotrope Funktion als sekretorisches Protein wahrscheinlich, was durch weitergehende Untersuchungen bestätigt werden muss.

4.5 LDOC1

Im Hinblick auf LDOC1 konnte anhand der Generation eines LDOC1-Expressionsplasmids die Untersuchung von LDOC1-überexprimierenden Zellen erfolgen. Eine Überexpression führte zu einem proapoptotischen Phänotyp (Buchholtz et al. 2013; Buchholtz et al. 2014). Inoue et al. (2005) erklärten dies durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und die Aktivierung des Caspase-3-abhängigen- und -unabhängigen Apoptosewegs. In dieser Arbeit diskutierten Inoue et al. ebenfalls die Beobachtung, dass ein durch LDOC1 erhöhtes Vorhandensein von p53 nicht auch mit einer gleichzeitig erhöhten Transkription des Protein p53 einherging. Mizutani et al. (2005) hielten dies für einen Hinweis dafür, dass LDOC1 die Degradation von p53 verhindert. In der unter Buchholtz et al. (2013) veröffentlichten Gemeinschaftsarbeit zeigte die transfizierte HeLa-Zelllinie keinen apoptotischen Phänotyp nach kurzzeitiger Expression; längere Inkubationszeiten jedoch führten zu einer Apoptose. Im Vergleich hierzu beschrieben Mizutani et al., dass die HeLa-Zelllinie die einzige von den untersuchten LDOC1-überexprimierenden Zervixkarzinomzelllinien blieb, die nach 16 Stunden Inkubationszeit nicht in die Apoptose eintrat. Unseres Erachtens könnten unsere Beobachtungen damit zu erklären sein, dass LDOC1 die Apoptose nicht direkt induziert, sondern zu zellphysiologischen Veränderungen führt, die die Apoptose einleiten bzw. begünstigen (Buchholtz et al. 2013).

Die erhöhte Apoptoserate der LDOC1-überexprimierenden Zellen könnte auf die tumorsuppressive Eigenschaft von LDOC1 hinweisen, was wiederum den Schluss zuließe, dass eine Inhibierung der LDOC1-Expression – wie durch die in Buchholtz et al. (2014) beschriebene Promotormethylierung – zu einem Selektionsvorteil der Tumorzellen führt. Die LDOC1-Expression könnte somit ein prädiktiver Marker für den Progress eines Karzinoms bzw. für das Ansprechen auf eine entsprechende Therapie darstellen, ebenso wie eine Möglichkeit der initialen Detektion von Tumorzellen. Entsprechende Arbeiten hierzu gab es z. B. bereits zum Ovarialkarzinom (Fang et al. 2014; Balch et al. 2009). Eine Inhibierung des Genabschnitts könnte damit mit einer Sensibilisierung der Tumorzellen für eine Chemotherapie einhergehen und in Zukunft therapeutische Schemata beeinflussen.

In künftigen Studien wäre eine weitere Untersuchung der LDOC1-Expression auf Proteinebene von Interesse. Da LDOC1 ein Protein darstellt, das in Zelllinien wie z. B. CaSki und HeLa bereits endogen exprimiert wird, wäre ebenfalls die Evaluation eines bestimmten Schwellenwertes zur Apoptoseinduktion durch LDOC1 von Nutzen. Bis zum Abschluss dieser Arbeit war kein kommerziell erhältlicher Antikörper für LDOC1 vorhanden. Es war daher notwendig, einen entsprechenden Expressionsvektor zur Antikörpermarkierung aufwendig zu generieren (wie z. B. in dieser Arbeit mit dem TOPO-Expressionsvektor geschehen). In aktuelleren Publikationen wird ein funktionierender kommerziell erhältlicher LDOC1-Antikörper beschrieben (Lee et al. 2015). Dies vereinfacht die Durchführung künftiger Untersuchungen und eröffnet neue Perspektiven.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte folgende Punkte:

- die Expression von CRIP1 in unterschiedlichen Krebszelllinien mit Schwerpunkt auf Brustkrebszelllinien
- die subzelluläre Lokalisation von CRIP1
- eine vermutete Korrelation zwischen Her2/neu und CRIP1
- die Expression von LDOC1 in Zervixkarzinomzelllinien

Die anfängliche Arbeitshypothese dieser Arbeit stützte sich auf Untersuchungen, die eine vermehrte Expression von CRIP1 in Brustkrebsgewebeproben zeigten, bei denen zugleich auch eine Her2/neu-Überexpression vorlag. Eine Korrelation der beiden Proteine und ein möglicher regulatorischer Zusammenhang wurden vermutet. Ziel dieser Studie war diesen Zusammenhang auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen und anhand etablierter Brustkrebszelllinien genauere Erkenntnisse in Bezug auf die zelluläre Expression, Lokalisation und die Regulationsmechanismen von CRIP1 zu erlangen.

In einer Immunfluoreszenzanalyse der Her2/neu-überexprimierenden Zelllinie MDA-MB-453 stellte sich eine starke CRIP1-Färbung dar, was die Hypothese einer vermehrten Expression von CRIP1 in Her2/neu-überexprimierenden Zelllinien unterstützte. Der Versuch einer Beeinflussung der Her2/neu-Aktivität mit dem Her2/neu-Liganden Heregulin oder mit inhibitorischen Medikamenten (Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib und Proteinkinaseinhibitor Sorafenib) konnte keine veränderte CRIP1-Expression bewirken. Eine direkte Regulation von CRIP1 durch Her2-(Über-)Aktivität konnte somit nicht nachgewiesen werden. Mittels der Methodik der FACS-Analyse wurde eine größere Anzahl von Krebszelllinien auf die jeweilige Expression von Her2/neu und CRIP1 untersucht und quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass unter Einschluss einer größeren Anzahl von Zelllinien eine signifikante Korrelation der beiden Gene weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Die CRIP1-Expression betreffend konnte jedoch ein auffallender Unterschied zwischen der nicht tumorösen Zelllinie MCF10A, den hochdifferenzierten Tumorzelllinien T47D und MCF7 und den niedrig bzw. undifferenzierten Tumorzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 beobachtet werden. Letztere zeigten eine deutlich erhöhte Expression, während die nicht tumoröse Zelllinie die niedrigste CRIP1-Expression aufwies. Eine Überexpression des Proteins in entdifferenzierten Zellen kann auf eine Relation von CRIP1 mit eventuell höhergradiger Malignität des Tumors und/oder mit einer Tumorprogression hinweisen.

Zur weiteren Untersuchung wurde darum humanes CRIP1 in einen rekombinanten Vektor kloniert und stabile CRIP1-überexprimierende Zelllinien generiert. Mithilfe eines Zytokin-Antikörper-Arrays konnte in diesen Klonen eine vermehrte Expression proangiogener und somit auch tumorfördernder Zytokine festgestellt werden. Eine Rolle von CRIP1 in der Immunabwehr wurde in Darmepithelien beschrieben und scheint von Tumorzellen während der Tumorprogression ausgenutzt zu werden. Anhand der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte eine auffallende Lokalisation von CRIP1 an der Stelle des Golgi-Apparates dargestellt werden, was auf eine massive Sekretion von CRIP1 durch Tumorzellen hinweist.

Ferner wurde mit der Generation eines LDOC1-Expressionsplasmids die Möglichkeit geschaffen den Einfluss einer LDOC1-Überexpression in Zervixkarzinomzelllinien zu untersuchen. Studien, die im Anschluss an diese Arbeit durchgeführt wurden, wiesen durch den entstandenen präapoptotischen Phänotyp auf eine tumorsuppressive Eigenschaft von LDOC1 in diesen Zelllinien hin.

Für künftige Forschung gilt es die Rolle der CRIP1-Expression in der Zelle zu beleuchten und den Unterschied in höhergradigen Tumorzellen genauer zu definieren. Damit kann herausgefunden werden ob CRIP1 als prognostischer und diagnostischer Marker in der Tumorthherapie verwendbar ist und klinisch angewendet werden kann. Selbiges gilt für LDOC1 in Bezug auf Zervix- und Ovarialkarzinome. Unsere Arbeitsgruppe (Buchholtz et al. 2014) identifizierte die Promotormethylierung als verantwortlichen Mechanismus für die Ausschaltung des Gens in unterschiedlichen gynäkologischen Tumorzelllinien. Das Erstellen von Methylierungsmustern in Tumorzellen scheint in Zukunft eine Möglichkeit der spezifischen Charakterisierung eines Tumors und könnte für Diagnose und Prognose von Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

- Arriola, Edurne; Marchio, Caterina; Tan, David S P; Drury, Suzanne C.; Lambros, Maryou B.; Natrajan, Rachael et al. (2008): Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88 (5), S. 491–503. DOI: 10.1038/labinvest.2008.19.
- Aziz, Moammir H.; Shen, Hong; Maki, Carl G. (2012): Glucocorticoid receptor activation inhibits p53-induced apoptosis of MCF10Amyc cells via induction of protein kinase C ϵ . In: *The Journal of biological chemistry* 287 (35), S. 29825–29836. DOI: 10.1074/jbc.M112.393256.
- Balch, Curt; Fang, Fang; Matei, Daniela E.; Huang, Tim H-M; Nephew, Kenneth P. (2009): Minireview: Epigenetic Changes in Ovarian Cancer. In: *Endocrinology* 150 (9), S. 4003–4011. DOI: 10.1210/en.2009-0404.
- Balluff, Benjamin; Rauser, Sandra; Meding, Stephan; Elsner, Mareike; Schöne, Cedrik; Feuchtinger, Annette et al. (2011): MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. In: *The American journal of pathology* 179 (6), S. 2720–2729. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.08.032.
- Bartram, Claus R.; Hiddemann, Wolfgang; Huber, Heinz (2010): Die Onkologie. 2., aktualisierte Aufl. Berlin [u.a.]: Springer.
- Bauer, Judith; Namineni, Sukumar; Reisinger, Florian; Zoller, Jessica; Yuan, Detian; Heikenwalder, Mathias (2012): Lymphotoxin, NF- κ B, and cancer: the dark side of cytokines. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 30 (5), S. 453–468. DOI: 10.1159/000341690.
- Baumhoer, Daniel; Elsner, Mareike; Smida, Jan; Zillmer, Stephanie; Rauser, Sandra; Schoene, Cedrik et al. (2011): CRIP1 expression is correlated with a favorable outcome and less metastases in osteosarcoma patients. In: *Oncotarget* 2 (12), S. 970–975.
- Baylin, Stephen B.; Ohm, Joyce E. (2006): Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? In: *Nature reviews. Cancer* 6 (2), S. 107–116. DOI: 10.1038/nrc1799.
- Billam, Madhavi; Sobolewski, Michele D.; Davidson, Nancy E. (2010): Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. In: *Breast cancer research and treatment* 120 (3), S. 581–592. DOI: 10.1007/s10549-009-0420-3.
- Birkenmeier, E. H.; Gordon, J. I. (1986): Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (8), S. 2516–2520.
- Breuleux, M. (2007a): Role of heregulin in human cancer. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (18), S. 2358–2377. DOI: 10.1007/s00018-007-7120-0.

- Breuleux, M. (2007b): Role of heregulin in human cancer. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (18), S. 2358–2377. DOI: 10.1007/s00018-007-7120-0.
- Buchholtz, Marie-Luise; Brüning, Ansgar; Mylonas, Ioannis; Jückstock, Julia (2014a): Epigenetic silencing of the LDOC1 tumor suppressor gene in ovarian cancer cells. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 290 (1), S. 149–154. DOI: 10.1007/s00404-014-3177-9.
- Buchholtz, Marie-Luise; Brüning, Ansgar; Mylonas, Ioannis; Jückstock, Julia (2014b): Epigenetic silencing of the LDOC1 tumor suppressor gene in ovarian cancer cells. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 290 (1), S. 149–154. DOI: 10.1007/s00404-014-3177-9.
- Buchholtz, Marie-Luise; Jückstock, Julia; Weber, Elena; Mylonas, Ioannis; Dian, Darius; Brüning, Ansgar (2013): Loss of LDOC1 expression by promoter methylation in cervical cancer cells. In: *Cancer investigation* 31 (9), S. 571–577. DOI: 10.3109/07357907.2013.845671.
- BUCK, MIRIAM B.; KNABBE, CORNELIUS (2006): TGF-Beta Signaling in Breast Cancer. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1089 (1), S. 119–126. DOI: 10.1196/annals.1386.024.
- Cetin, Bulent; Benekli, Mustafa; Turker, Ibrahim; Koral, Lokman; Ulas, Arife; Dane, Faysal et al. (2014): Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer: a multicentre study of Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO). In: *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 26 (5), S. 300–305. DOI: 10.1179/1973947813Y.00000000147.
- Chen, Yan; Miller, Christine; Mosher, Rebecca; Zhao, Xumei; Deeds, Jim; Morrissey, Mike et al. (2003): Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. In: *Cancer research* 63 (8), S. 1927–1935.
- Cheng, Jonathan C.; Matsen, Cindy B.; Gonzales, Felicidad A.; Ye, Wei; Greer, Sheldon; Marquez, Victor E. et al. (2003): Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. In: *Journal of the National Cancer Institute* 95 (5), S. 399–409.
- Chiang, Eugene Y.; Kolumam, Ganesh A.; Yu, Xin; Francesco, Michelle; Ivelja, Sinisa; Peng, Ivan et al. (2009): Targeted depletion of lymphotoxin-alpha-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. In: *Nature medicine* 15 (7), S. 766–773. DOI: 10.1038/nm.1984.
- Choi, Yoomi; Lee, Hee Jin; Jang, Min Hye; Gwak, Jae Moon; Lee, Kyu Sang; Kim, Eun Joo et al.: Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. In: *Human Pathology* 44 (11), S. 2581–2589. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.07.003.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

- Cole, M. P.; Jones, C. T.; Todd, I. D. (1971): A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. In: *British journal of cancer* 25 (2), S. 270–275.
- Cousins, R. J.; Lanningham-Foster, L. (2000a): Regulation of cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, by mediators of the immune response. In: *J Infect Dis* 182 Suppl 1, S. S81-4. DOI: 10.1086/315917.
- Cousins, Robert J.; Lanningham-Foster, Lorraine (2000b): Regulation of Cysteine-Rich Intestinal Protein, a Zinc Finger Protein, by Mediators of the Immune Response. In: *J Infect Dis* 182 (s1), S. S81. DOI: 10.1086/315917.
- Davis, F. M.; Azimi, I.; Faville, R. A.; Peters, A. A.; Jalink, K.; Putney, J W Jr et al. (2014): Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. In: *Oncogene* 33 (18), S. 2307–2316. DOI: 10.1038/onc.2013.187.
- Dawid, I. B.; Breen, J. J.; Toyama, R. (1998): LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. In: *Trends in genetics : TIG* 14 (4), S. 156–162.
- Duzkale, Hatice; Schweighofer, Carmen D.; Coombes, Kevin R.; Barron, Lynn L.; Ferrajoli, Alessandra; O'Brien, Susan et al. (2011): LDOC1 mRNA is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia and predicts overall survival in untreated patients. In: *Blood* 117 (15), S. 4076–4084. DOI: 10.1182/blood-2010-09-304881.
- Fang, Fang; Munck, Joanne; Tang, Jessica; Taverna, Pietro; Wang, Yinu; Miller, David F. B. et al. (2014): The novel, small molecule DNA methylation inhibitor SGI-110 as an ovarian cancer chemosensitizer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (24), S. 6504–6516. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1553.
- Fava, Roy A.; Notidis, Evangelia; Hunt, Jane; Szanya, Veronika; Ratcliffe, Nora; Ngam-Ek, Apinya et al. (2003): A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (1), S. 115–126.
- Franchimont, D. (2004): Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1024, S. 124–137. DOI: 10.1196/annals.1321.009.
- Gaffney, E. V. (1982): A cell line (HBL-100) established from human breast milk. In: *Cell and tissue research* 227 (3), S. 563–568.
- Gajria, Devika; Chandarlapaty, Sarat (2011): HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. In: *Expert review of anticancer therapy* 11 (2), S. 263–275. DOI: 10.1586/era.10.226.

- Garcia-Barcelo, M.; Tsui, S. K.; Chim, S. S.; Fung, K. P.; Lee, C. Y.; Waye, M. M. (1998): Mapping of the human cysteine-rich intestinal protein gene CRIP1 to the human chromosomal segment 7q11.23. In: *Genomics* 47 (3), S. 419–422. DOI: 10.1006/geno.1997.5134.
- Gaudet, François; Hodgson, J. Graeme; Eden, Amir; Jackson-Grusby, Laurie; Dausman, Jessica; Gray, Joe W. et al. (2003): Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 300 (5618), S. 489–492. DOI: 10.1126/science.1083558.
- Ghaderi, Mehran; Wallin, Keng-Ling; Wiklund, Fredrik; Zake, Liene Nikitina; Hallmans, Göran; Lenner, Per et al. (2002a): Risk of invasive cervical cancer associated with polymorphic HLA DR/DQ haplotypes. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 100 (6), S. 698–701. DOI: 10.1002/ijc.10551.
- Ghaderi, Mehran; Wallin, Keng-Ling; Wiklund, Fredrik; Zake, Liene Nikitina; Hallmans, Göran; Lenner, Per et al. (2002b): Risk of invasive cervical cancer associated with polymorphic HLA DR/DQ haplotypes. In: *Int. J. Cancer* 100 (6), S. 698–701. DOI: 10.1002/ijc.10551.
- Gold, Leslie I. (1998): The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. In: *Critical reviews in oncogenesis* 10 (4), S. 303–360.
- Greenblatt, M. S.; Bennett, W. P.; Hollstein, M.; Harris, C. C. (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. In: *Cancer research* 54 (18), S. 4855–4878.
- Greider, C. W.; Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. In: *Cell* 43 (2 Pt 1), S. 405–413.
- Groene, Joern; Mansmann, Ulrich; Meister, Reinhard; Staub, Eike; Roepcke, Stefan; Heinze, Maya et al. (2006): Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119 (8), S. 1829–1836. DOI: 10.1002/ijc.22027.
- Hall, J. M.; Lee, M. K.; Newman, B.; Morrow, J. E.; Anderson, L. A.; Huey, B.; King, M. C. (1990): Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (4988), S. 1684–1689.
- Hallquist, N. A.; Khoo, C.; Cousins, R. J. (1996): Lipopolysaccharide regulates cysteine-rich intestinal protein, a zinc-finger protein, in immune cells and plasma. In: *Journal of leukocyte biology* 59 (2), S. 172–177.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hao, Jihua; Serohijos, Adrian W. R.; Newton, Gail; Tassone, Gina; Wang, Zuncai; Sgroi, Dennis C. et al. (2008): Identification and Rational Redesign of Peptide Ligands to CRIP1, A Novel Biomarker for Cancers. In: *PLoS Comput Biol* 4 (8), S. e1000138. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000138.

- Hartmann, Lynn C.; Degnim, Amy C.; Santen, Richard J.; Dupont, William D.; Ghosh, Karthik (2015): Atypical hyperplasia of the breast--risk assessment and management options. In: *The New England journal of medicine* 372 (1), S. 78–89. DOI: 10.1056/NEJMSr1407164.
- Hempe, J. M.; Cousins, R. J. (1991): Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (21), S. 9671–9674.
- Hempe, J. M.; Cousins, R. J. (1992): Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. In: *The Journal of nutrition* 122 (1), S. 89–95.
- Hiddemann, Wolfgang (2010): Die Onkologie. 2., aktualisierte Aufl. Berlin: Springer (SpringerLink : Bücher).
- Holmes, W. E.; Sliwkowski, M. X.; Akita, R. W.; Henzel, W. J.; Lee, J.; Park, J. W. et al. (1992): Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. In: *Science (New York, N.Y.)* 256 (5060), S. 1205–1210.
- Huang, Joseph; Plass, Christoph; Gerhauser, Clarissa (2011): Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. In: *Current drug targets* 12 (13), S. 1925–1956.
- Hudis, Clifford A. (2007): Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. In: *The New England journal of medicine* 357 (1), S. 39–51. DOI: 10.1056/NEJMr043186.
- Inoue, Mikiya; Takahashi, Kyoko; Niide, Osamu; Shibata, Masahiko; Fukuzawa, Masahiro; Ra, Chisei (2005): LDOC1, a novel MZF-1-interacting protein, induces apoptosis. In: *FEBS letters* 579 (3), S. 604–608. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.12.030.
- Jelovac, Danijela; Wolff, Antonio C. (2012): The adjuvant treatment of HER2-positive breast cancer. In: *Current treatment options in oncology* 13 (2), S. 230–239. DOI: 10.1007/s11864-012-0186-4.
- Jeong, Hoiseon; Ryu, Young-joon; An, Jungsuk; Lee, Youngseok; Kim, Aeree (2012): Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. In: *Histopathology* 60 (6B), S. E87-95. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04195.x.
- Jurata, L. W.; Kenny, D. A.; Gill, G. N. (1996): Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21), S. 11693–11698.
- Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010 (2013). Unter Mitarbeit von Peter Kaatsch, Claudia Spix, Stefan Hentschel, Alexander Katalinic, Sabine Luttmann, Christa Stegmaier et al. 9. Aufl., neue Ausg. Berlin: Robert Koch-Institut (Gesundheitsberichterstattung für Deutschland).
- Kadrmaz, Julie L.; Beckerle, Mary C. (2004): The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (11), S. 920–931. DOI: 10.1038/nrm1499.

- Kalluri, Raghu; Neilson, Eric G. (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. In: *Journal of Clinical Investigation* 112 (12), S. 1776–1784. DOI: 10.1172/JCI200320530.
- Kalluri, Raghu; Weinberg, Robert A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6), S. 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Kaufmann, Manfred (2011): Die Gynäkologie. 3., vollst. überarb.u. aktualisierte Aufl. Berlin: Springer Berlin.
- Kawakami, Hisato; Yonesaka, Kimio (2016): HER3 and its Ligand, Heregulin, as Targets for Cancer Therapy. In: *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 11 (3), S. 267–274.
- Khoo, C., et al.: Human Cysteine-Rich Intestinal Protein: cDNA Cloning and Expression of Recombinant Protein and Identification in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, zuletzt geprüft am 10.11.2014.
- Khurana, Ashwani; Gonzalez-Guerrico, Anitilde; Lupu, Ruth (2014): Heregulin in breast cancer: old story, new paradigm. In: *Current pharmaceutical design* 20 (30), S. 4874–4878.
- Knudson, A. G. (1997): Hereditary predisposition to cancer. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 833, S. 58–67.
- Kolch, W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. In: *The Biochemical journal* 351 Pt 2, S. 289–305.
- Konecny, G. E.; Venkatesan, N.; Yang, G.; Dering, J.; Ginther, C.; Finn, R. et al. (2008): Activity of lapatinib a novel HER2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cancer cells. In: *British journal of cancer* 98 (6), S. 1076–1084. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604278.
- Konecny, Gottfried E.; Pegram, Mark D.; Venkatesan, Natarajan; Finn, Richard; Yang, Guorong; Rahmeh, Martina et al. (2006): Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. In: *Cancer research* 66 (3), S. 1630–1639. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1182.
- Kouprina, Natalay; Pavlicek, Adam; Noskov, Vladimir N.; Solomon, Greg; Otstot, John; Isaacs, William et al. (2005): Dynamic structure of the SPANX gene cluster mapped to the prostate cancer susceptibility locus HPCX at Xq27. In: *Genome research* 15 (11), S. 1477–1486. DOI: 10.1101/gr.4212705.
- Lane, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. In: *Nature* 358 (6381), S. 15–16. DOI: 10.1038/358015a0.
- Lanningham-Foster, Lorraine; Green, Calvert L.; Langkamp-Henken, Bobbi; Davis, Barbara A.; Nguyen, Khanh T.; Bender, Bradley S.; Cousins, Robert J. (2002a): Overexpression of CRIP in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 (6), S. E1197. DOI: 10.1152/ajpendo.00508.2001.

- Lanningham-Foster, Lorraine; Green, Calvert L.; Langkamp-Henken, Bobbi; Davis, Barbara A.; Nguyen, Khanh T.; Bender, Bradley S.; Cousins, Robert J. (2002b): Overexpression of CRIP in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 282 (6), S. E1197-203. DOI: 10.1152/ajpendo.00508.2001.
- Lee, Chia-Huei; Pan, Kao-Lu; Tang, Ya-Chu; Tsai, Ming-Hsien; Cheng, Ann-Joy; Shen, Mei-Ya et al. (2015): LDOC1 silenced by cigarette exposure and involved in oral neoplastic transformation. In: *Oncotarget* 6 (28), S. 25188–25201. DOI: 10.18632/oncotarget.4512.
- Lee, Chia-Huei; Wong, Thian-Sze; Chan, Jimmy Yu-Wai; Lu, Shao-Chun; Lin, Pinpin; Cheng, Ann-Joy et al. (2013a): Epigenetic regulation of the X-linked tumour suppressors BEX1 and LDOC1 in oral squamous cell carcinoma. In: *The Journal of pathology* 230 (3), S. 298–309. DOI: 10.1002/path.4173.
- Lee, Chia-Huei; Wong, Thian-Sze; Chan, Jimmy Yu-Wai; Lu, Shao-Chun; Lin, Pinpin; Cheng, Ann-Joy et al. (2013b): Epigenetic regulation of the X-linked tumour suppressors BEX1 and LDOC1 in oral squamous cell carcinoma. In: *J. Pathol.* 230 (3), S. 298–309. DOI: 10.1002/path.4173.
- Leminen, A. (1990): Tumor markers CA 125, carcinoembryonic antigen and tumor-associated trypsin inhibitor in patients with cervical adenocarcinoma. In: *Gynecologic oncology* 39 (3), S. 358–363.
- Levenson, C. W.; Shay, N. F.; Lee-Ambrose, L. M.; Cousins, R. J. (1993): Regulation of cysteine-rich intestinal protein by dexamethasone in the neonatal rat. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (2), S. 712–715.
- Li, F. P.; Fraumeni, J. F. (1969): Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. In: *Journal of the National Cancer Institute* 43 (6), S. 1365–1373.
- Li, Yan M.; Pan, Yong; Wei, Yongkun; Cheng, Xiaoyun; Zhou, Binhua P.; Tan, Ming et al. (2004): Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. In: *Cancer cell* 6 (5), S. 459–469. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.09.027.
- Liepinsh, Dmitry J.; Grivennikov, Sergei I.; Klarmann, Kimberly D.; Lagarkova, Maria A.; Drutskaya, Marina S.; Lockett, Stephen J. et al. (2006): Novel lymphotoxin alpha (LTalpha) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LTalpha biological functions. In: *Molecular and cellular biology* 26 (11), S. 4214–4225. DOI: 10.1128/MCB.01751-05.
- Liu, Shuqian; Stromberg, Arnold; Tai, Hsin-Hsiung; Moscow, Jeffrey A. (2004): Thiamine transporter gene expression and exogenous thiamine modulate the expression of genes involved in drug and prostaglandin metabolism in breast cancer cells. In: *Molecular cancer research : MCR* 2 (8), S. 477–487.
- Lowy, Douglas R.; Solomon, Diane; Hildesheim, Allan; Schiller, John T.; Schiffman, Mark (2008): Human papillomavirus infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer. In: *Cancer* 113 (7 Suppl), S. 1980–1993. DOI: 10.1002/cnccr.23704.

- Ludyga, Natalie; Englert, Sonja; Pflieger, Kerstin; Rauser, Sandra; Braselmann, Herbert; Walch, Axel et al. (2013a): The impact of cysteine-rich intestinal protein 1 (CRIP1) in human breast cancer. In: *Molecular cancer* 12, S. 28. DOI: 10.1186/1476-4598-12-28.
- Ludyga, Natalie; Englert, Sonja; Pflieger, Kerstin; Rauser, Sandra; Braselmann, Herbert; Walch, Axel et al. (2013b): The impact of Cysteine-Rich Intestinal Protein 1 (CRIP1) in human breast cancer. In: *Mol Cancer* 12 (1), S. 28. DOI: 10.1186/1476-4598-12-28.
- Lynch, H. T.; Larsen, A. L.; Magnuson, C. W.; Krush, A. J. (1966): Prostate carcinoma and multiple primary malignancies. Study of a family and 109 consecutive prostate cancer patients. In: *Cancer* 19 (12), S. 1891–1897.
- Ma, X.-J.; Salunga, R.; Tuggle, J. T.; Gaudet, J.; Enright, E.; McQuary, P. et al. (2003a): Gene expression profiles of human breast cancer progression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10), S. 5974–5979. DOI: 10.1073/pnas.0931261100.
- Ma, Xiao-Jun; Salunga, Ranelle; Tuggle, J. Todd; Gaudet, Justin; Enright, Edward; McQuary, Philip et al. (2003b): Gene expression profiles of human breast cancer progression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10), S. 5974–5979. DOI: 10.1073/pnas.0931261100.
- Mackay, Alan; Jones, Chris; Dexter, Tim; Silva, Ricardo L A; Bulmer, Karen; Jones, Allison et al. (2003a): cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. In: *Oncogene* 22 (17), S. 2680–2688. DOI: 10.1038/sj.onc.1206349.
- Mackay, Alan; Jones, Chris; Dexter, Tim; Silva, Ricardo L A; Bulmer, Karen; Jones, Allison et al. (2003b): cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. In: *Oncogene* 22 (17), S. 2680–2688. DOI: 10.1038/sj.onc.1206349.
- Mackay, Alan; Tamber, Narinder; Fenwick, Kerry; Iravani, Marjan; Grigoriadis, Anita; Dexter, Tim et al. (2009): A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines. In: *Breast cancer research and treatment* 118 (3), S. 481–498. DOI: 10.1007/s10549-008-0296-7.
- Marchuk, D.; Drumm, M.; Saulino, A.; Collins, F. S. (1991): Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. In: *Nucleic acids research* 19 (5), S. 1154.
- Masuda, Hiroko; Zhang, Dongwei; Bartholomeusz, Chandra; Doihara, Hiroyoshi; Hortobagyi, Gabriel N.; Ueno, Naoto T. (2012a): Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 136 (2), S. 331–345. DOI: 10.1007/s10549-012-2289-9.
- Masuda, Hiroko; Zhang, Dongwei; Bartholomeusz, Chandra; Doihara, Hiroyoshi; Hortobagyi, Gabriel N.; Ueno, Naoto T. (2012b): Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 136 (2), S. 10.1007/s10549-012-2289-9. DOI: 10.1007/s10549-012-2289-9.

- Matsuo, Koji; Mabuchi, Seiji; Okazawa, Mika; Kawano, Mahiru; Kuroda, Hiromasa; Kamiura, Shoji; Kimura, Tadashi (2014): Clinical implication of surgically treated early-stage cervical cancer with multiple high-risk factors. In: *Journal of Gynecologic Oncology* 26 (1), S. 3–11. DOI: 10.3802/jgo.2015.26.1.3.
- Miki, Y.; Swensen, J.; Shattuck-Eidens, D.; Futreal, P. A.; Harshman, K.; Tavtigian, S. et al. (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. In: *Science (New York, N.Y.)* 266 (5182), S. 66–71.
- Mizutani, Kiyohito; Koike, Daisuke; Suetsugu, Shiro; Takenawa, Tadaomi (2005): WAVE3 functions as a negative regulator of LDOC1. In: *Journal of biochemistry* 138 (5), S. 639–646. DOI: 10.1093/jb/mvi160.
- Molina, Rafael; Filella, Xavier; Augé, Jose M.; Bosch, Elvira; Torne, Aureli; Pahisa, Jaume et al. (2005): CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. In: *Anticancer research* 25 (3A), S. 1765–1771.
- Moscicki, Anna-Barbara; Schiffman, Mark; Burchell, Ann; Albero, Ginesa; Giuliano, Anna; Goodman, Marc T. et al. (2012): Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. In: *Vaccine* 30 (0 5), S. F24. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.05.089.
- Mullis, K. B. (1990): Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. In: *Ann Biol Clin (Paris)* 48 (8), S. 579–582.
- Murphy, Danielle A.; Makonnen, Sosina; Lassoued, Wiem; Feldman, Michael D.; Carter, Christopher; Lee, William M. F. (2006): Inhibition of Tumor Endothelial ERK Activation, Angiogenesis, and Tumor Growth by Sorafenib (BAY43-9006). In: *The American journal of pathology* 169 (5), S. 1875–1885. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050711.
- Murray, P. A.; Barrett-Lee, P.; Travers, M.; Luqmani, Y.; Powles, T.; Coombes, R. C. (1993): The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer. In: *British journal of cancer* 67 (6), S. 1408–1412. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1968492/>.
- Nagasaki, K.; Manabe, T.; Hanzawa, H.; Maass, N.; Tsukada, T.; Yamaguchi, K. (1999): Identification of a novel gene, LDOC1, down-regulated in cancer cell lines. In: *Cancer letters* 140 (1-2), S. 227–234.
- Nagasaki, Koichi; Schem, Christian; Kaisenberg, Constantin von; Biallek, Marco; Rösel, Frank; Jonat, Walter; Maass, Nicolai (2003): Leucine-zipper protein, LDOC1, inhibits NF-kappaB activation and sensitizes pancreatic cancer cells to apoptosis. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 105 (4), S. 454–458. DOI: 10.1002/ijc.11122.
- National Cancer Institute (2015): Cancer Statistics Review, 1975-2012 - SEER Statistics. Hg. v. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). Online verfügbar unter http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, zuletzt aktualisiert am 23.04.2015, zuletzt geprüft am 28.04.2015.

- Nelson, Michael H.; Dolder, Christian R. (2006): Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. In: *The Annals of pharmacotherapy* 40 (2), S. 261–269. DOI: 10.1345/aph.1G387.
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. In: *The EMBO journal* 1 (7), S. 841–845.
- Niloff, J. M.; Klug, T. L.; Schaetzl, E.; Zurawski, V. R.; Knapp, R. C.; Bast, R. C. (1984): Elevation of serum CA125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium, and endocervix. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 148 (8), S. 1057–1058.
- Oda, Kanae; Matsuoka, Yukiko; Funahashi, Akira; Kitano, Hiroaki (2005): A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. In: *Molecular systems biology* 1, S. 2005.0010. DOI: 10.1038/msb4100014.
- Ogawa, R.; Ishiguro, H.; Kuwabara, Y.; Kimura, M.; Mitsui, A.; Mori, Y. et al. (2008): Identification of candidate genes involved in the radiosensitivity of esophageal cancer cells by microarray analysis. In: *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E* 21 (4), S. 288–297. DOI: 10.1111/j.1442-2050.2007.00759.x.
- Peltomäki, Päivi (2012): Mutations and epimutations in the origin of cancer. In: *Experimental cell research* 318 (4), S. 299–310. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.12.001.
- Perez-Plasencia, Carlos; Duenas-Gonzalez, Alfonso (2006): Can the state of cancer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy? In: *Molecular cancer* 5 (1), S. 27. DOI: 10.1186/1476-4598-5-27.
- Pfeiffer, D.; Stellwag, B.; Pfeiffer, A.; Borlinghaus, P.; Meier, W.; Scheidel, P. (1989): Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix. In: *Gynecologic oncology* 33 (2), S. 146–150.
- Piccart-Gebhart, Martine J.; Procter, Marion; Leyland-Jones, Brian; Goldhirsch, Aron; Untch, Michael; Smith, Ian et al. (2005): Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. In: *N Engl J Med* 353 (16), S. 1659–1672. DOI: 10.1056/NEJMoa052306.
- Rauser, Sandra; Marquardt, Claudio; Balluff, Benjamin; Deininger, Sören-Oliver; Albers, Christian; Belau, Eckhard et al. (2010): Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. In: *Journal of proteome research* 9 (4), S. 1854–1863. DOI: 10.1021/pr901008d.
- Ressing, M.; König, J.; Glodny, S.; Blettner, M.; Klug, S. (2010): Metaanalyse publizierter Daten zur Assoziation des TP53 Codon 72 Polymorphismus und dem Zervixkarzinom. In: *Gesundheitswesen* 72 (08/09). DOI: 10.1055/s-0030-1266495.
- Ruddle, Nancy H. (2014): Lymphotoxin and TNF: How it all began- A tribute to the travelers. In: *Cytokine & growth factor reviews* 25 (2), S. 83–89. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.02.001.

- Sahasrabuddhe, Vikrant V.; Luhn, Patricia; Wentzensen, Nicolas (2011): Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. In: *Future microbiology* 6 (9), S. 10.2217/fmb.11.87. DOI: 10.2217/fmb.11.87.
- Santin, Alessandro D.; Zhan, Fenghuang; Bignotti, Eliana; Siegel, Eric R.; Cané, Stefania; Bellone, Stefania et al. (2005): Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. In: *Virology* 331 (2), S. 269–291. DOI: 10.1016/j.virol.2004.09.045.
- Saslow, Debbie; Solomon, Diane; Lawson, Herschel W.; Killackey, Maureen; Kulasingam, Shalini; Cain, Joanna et al. (2012): American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 62 (3), S. 147–172. DOI: 10.3322/caac.21139.
- Schaal, Courtney; Pillai, Smitha; Chellappan, Srikumar P. (2014): The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis. In: *Advances in cancer research* 121, S. 147–182. DOI: 10.1016/B978-0-12-800249-0.00004-4.
- Scherer, W. F.; Syverton, J. T.; Gey, G. O. (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. In: *The Journal of experimental medicine* 97 (5), S. 695–710.
- Schwartzberg, Lee S.; Tauer, Kurt W.; Hermann, Robert C.; Makari-Judson, Grace; Isaacs, Claudine; Beck, J. Thaddeus et al. (2013): Sorafenib or placebo with either gemcitabine or capecitabine in patients with HER-2-negative advanced breast cancer that progressed during or after bevacizumab. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (10), S. 2745–2754. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3177.
- Sharp, Andrew J.; Locke, Devin P.; McGrath, Sean D.; Cheng, Ze; Bailey, Jeffrey A.; Vallente, Rhea U. et al. (2005): Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. In: *American journal of human genetics* 77 (1), S. 78–88. DOI: 10.1086/431652.
- Sinn, H-P; Helmchen, B.; Wittekind, C. H. (2010): TNM-Klassifikation beim Mammakarzinom. Neuerungen und Anmerkungen zur 7. Auflage. In: *Der Pathologe* 31 (5), S. 361–366. DOI: 10.1007/s00292-010-1307-0.
- Slamon, D.; Clark, G.; Wong, S.; Levin, W.; Ullrich, A.; McGuire, W. (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. In: *Science* 235 (4785), S. 177–182. DOI: 10.1126/science.3798106.
- Smith, Ian; Procter, Marion; Gelber, Richard D.; Guillaume, Sebastien; Feyereislova, Andrea; Dowsett, Mitch et al. (2007): 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 369 (9555), S. 29–36. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60028-2.

- Sonnenschein, Carlos; Soto, Ana M. (2013): The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. In: *Journal of biosciences* 38 (3), S. 651–663.
- Stanley, M. A.; Pett, M. R.; Coleman, N. (2007): HPV: from infection to cancer. In: *Biochemical Society transactions* 35 (Pt 6), S. 1456–1460. DOI: 10.1042/BST0351456.
- Stewart, Bernard W. (2014): World cancer report. Lyon: IARC Press.
- Subik, Kristina; Lee, Jin-Feng; Baxter, Laurie; Strzepek, Tamera; Costello, Dawn; Crowley, Patti et al. (2010): The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. In: *Breast cancer : basic and clinical research* 4, S. 35–41.
- Terris, Benoit; Blaveri, Ekaterina; Crnogorac-Jurcevic, Tatjana; Jones, Melanie; Missiaglia, Edoardo; Ruszniewski, Philippe et al. (2002): Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. In: *The American journal of pathology* 160 (5), S. 1745–1754. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61121-2.
- Togni, P. de; Goellner, J.; Ruddle, N. H.; Streeter, P. R.; Fick, A.; Mariathasan, S. et al. (1994): Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5159), S. 703–707.
- Toi, Masakazu; Nakamura, Takashi; Mukaida, Hidenori; Wada, Tsutomu; Osaki, Akihiko; Yamada, Hirofumi et al. (1990): Relationship between epidermal growth factor receptor status and various prognostic factors in human breast cancer. In: *Cancer* 65 (9), S. 1980–1984. DOI: 10.1002/1097-0142(19900501)65:9<1980::AID-CNCR2820650917>3.0.CO;2-U.
- Traut, H. F.; Papanicolaou, G. N. (1943): Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. In: *California and western medicine* 59 (2), S. 121–122.
- Vilasco, Myriam; Communal, Laudine; Hugon-Rodin, Justine; Penault-Llorca, Frederique; Mourra, Najat; Wu, Zherui et al. (2013): Loss of glucocorticoid receptor activation is a hallmark of BRCA1-mutated breast tissue. In: *Breast cancer research and treatment* 142 (2), S. 283–296. DOI: 10.1007/s10549-013-2722-8.
- Vineis, P.; Schatzkin, A.; Potter, J. D. (2010): Models of carcinogenesis: an overview. In: *Carcinogenesis* 31 (10), S. 1703–1709. DOI: 10.1093/carcin/bgq087.
- Walboomers, J. M.; Jacobs, M. V.; Manos, M. M.; Bosch, F. X.; Kummer, J. A.; Shah, K. V. et al. (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. In: *The Journal of pathology* 189 (1), S. 12–19. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- Wang, Q.; Williamson, M.; Bott, S.; Brookman-Amis, N.; Freeman, A.; Nariculam, J. et al. (2007): Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. In: *Oncogene* 26 (45), S. 6560–6565. DOI: 10.1038/sj.onc.1210472.
- Weinberg, Robert A. (1999): One renegade call. How cancer begins. 1. paperback ed. New York: Basic Books (Science masters series).

- Wilson, Katherine S.; Roberts, Helen; Leek, Russell; Harris, Adrian L.; Geradts, Joseph (2002): Differential gene expression patterns in HER2/neu-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues. In: *The American journal of pathology* 161 (4), S. 1171–1185. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64394-5.
- Wooster, R.; Stratton, M. R. (1995): Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. In: *Trends in genetics : TIG* 11 (1), S. 3–5.
- Wu, Wei; Pew, Travis; Zou, Min; Pang, Diana; Conzen, Suzanne D. (2005): Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (6), S. 4117–4124. DOI: 10.1074/jbc.M411200200.
- Zafrakas, Menelaos; Papasozomenou, Panayiota; Emmanouilides, Christos (2016): Sorafenib in breast cancer treatment: A systematic review and overview of clinical trials. In: *World Journal of Clinical Oncology* 7 (4), S. 331–336. DOI: 10.5306/wjco.v7.i4.331.
- Zhang, Rong; He, Yi-feng; Chen, Mo; Chen, Chun-mei; Zhu, Qiu-jing; Lu, Huan et al. (2014): Diagnosis of 25 genotypes of human papillomaviruses for their physical statuses in cervical precancerous/cancerous lesions: a comparison of E2/E6E7 ratio-based vs. multiple E1-L1/E6E7 ratio-based detection techniques. In: *Journal of translational medicine* 12, S. 282. DOI: 10.1186/s12967-014-0282-2.

Internetquellen

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].

J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer doi:10.1002/ijc.29210 PMID:25220842 Published online 9 October 2014

Leonardo Da Vinci project, „Einleitung- und Überblick zur Entstehung des Pap-Abstriches bis zum aktuellen Stand im Zervixkarzinomscreening“, <http://www.eurocytology.eu>, 23.06.2017

Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, 07.07.2017

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

Buchholtz, M. L., J. Juckstock, E. Weber, I. Mylonas, D. Dian and A. Brüning (2013).
“Loss of LDOC1 expression by promotor methylation in cervical cancer cells.”
Cancer Invest 31(9): 571-577.

Posterpräsentation:

E. Weber, S. Rauser, A. Walch, I. Mylonas, A. Brüning (2011). “Is CRIP1 a target
gene of HER2?”

53rd Symposium of the Society for Histochemistry – Current Role of Histochemistry in
Preclinical and Clinical Research (Oktober 12-15, 2011)

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Dr. hc. Ioannis Mylonas für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilian-Universität München durchführen zu dürfen.

Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Ansgar Brüning für seinen wissenschaftlichen, methodischen und moralischen Beistand sowie die Begleitung mit engelsgleicher Geduld während der gesamten Arbeit an dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. med. Axel Walch für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und den unverzichtbaren Baustein, den CRIP1-Antikörper, der unsere Experimente an CRIP1 erst möglich machte.

Frau Martina Rahmeh und dem Team der medizinisch technischen Assistenten des Forschungslabors der Frauenklinik des Klinikum Großhadern für die Durchführung der Messungen am FACS-Gerät.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben und mir stets ein Vorbild und Ansporn sind, die ärztliche Tätigkeit gewissenhaft, gründlich und mit Freude auszuführen.

Meinen Freunden, denn ich habe das große Glück, sie in jeder Lebenslage an meiner Seite zu wissen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Klonierung, Expression und subzelluläre Lokalisation zweier tumorassoziierter Gene – CRIP1 und LDOC1“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, den 15.03.2018

.....

Elena R. M. Weber